

T H E S E

présentée

A LA FACULTE DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS

(Mention Pharmacie)

par

Yvonne VULLIEMOZ

Soutenue le 3 Juin 1969

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DES EFFETS METABOLIQUES DE L'OUABAIN

JURY : M. le Professeur VALETTE Président
 M. le Professeur COURTOIS Examineurs
 M. le Professeur ROSSIGNOL

T H E S E

présentée

A LA FACULTE DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS

(Mention Pharmacie)

par

Yvonne VULLIEMOZ

Soutenue le 3 Juin 1969

**CONTRIBUTION A L'ETUDE
DES EFFETS METABOLIQUES DE L'OUABAIN**

JURY : M. le Professeur VALETTE Président
 M. le Professeur COURTOIS Examineurs
 M. le Professeur ROSSIGNOL



A mes Parents

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Recherche du Département d'Anesthésiologie de l'Université de Columbia à New York, sous la direction de Monsieur le Professeur Nahas, qui nous a accueilli, confié le sujet de cette thèse et qui a suivi nos travaux avec une attention bienveillante; nous voudrions lui exprimer ici toute notre gratitude et notre respectueux dévouement.

Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur Valette, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du Jury de cette thèse. Nos remerciements vont également à Messieurs les Professeurs Courtois et Rossignol, qui ont bien voulu faire partie de ce Jury.

Nous devons notre initiation à la recherche pharmacologique à Monsieur le Professeur Triner; il nous a guidé judicieusement au cours de notre travail, auquel il a porté un intérêt constant, ne nous ménageant ni son temps, ni ses conseils, ni ses critiques; nous sommes heureux de lui exprimer, en cette occasion, notre profonde reconnaissance.

Nous voudrions aussi remercier Mademoiselle Verosky de l'intérêt qu'elle nous a témoigné et des encouragements qu'elle nous a donnés.

Nous remercions Monsieur le Docteur Castany pour les pancréatectomies qu'il a faites chez les chiens étudiés.

Nous remercions enfin tous nos amis du Laboratoire, dont l'aide efficace nous a été si utile, et tous ceux, qui, à titres divers, ont contribué à l'élaboration de ce travail.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS.

INTRODUCTION

	1.
1. Action pharmacologique des glucosides cardiotoniques.	1
A. Action sur le transport actif	1
- Action sur l'ATPase membranaire	2
- Action sur le taux intracellulaire de potassium et de calcium	5
- Glucosides des cardiotoniques et transport du glucose	7
B. Action métabolique.	7
2. But de ce travail.	9
3. Systèmes enzymatiques du métabolisme glucidique et lipidique se rapportant à notre étude	11
A. Les lipases	11
B. Phosphorylase, synthétase du glycogène et phosphofructokinase	12
- La phosphorylase	12
- La synthétase du glycogène	14
- La phosphofructokinase	16
C. Le système activateur des enzymes lipolytiques et glycolytiques	17
- L'adenyl cyclase	18
- La phosphodiesterase	19

<u>EXPERIENCES IN VITRO</u>	21
-----------------------------	----

<u>METHODES</u>	21
-----------------	----

1. La lipolyse	21
- Incubation du tissu adipeux	21
- Mesures biochimiques: glycérol	22
2. Métabolisme des glucides	24
- Incubation du diaphragme	24
- Mesures biochimiques: glycogène	25
métabolites intermédiaires	25
G-6-P, F-6-P, G-1-P, F-1-6-P	26
glucose	29
acide lactique	29
acide pyruvique	30
consommation d'oxygène	30
3. Expression des résultats	31
4. Produits utilisés	32

<u>RESULTATS</u>	33
------------------	----

1. Action de l'ouabaine sur la lipolyse	33
A. Action de l'ouabaine sur la lipolyse spontanée	33
B. Action de l'ouabaine sur la lipolyse stimulée par les catécholamines	33
C. Action de l'ouabaine sur la lipolyse stimulée par le dibutyryl-ATP cyclique et la théophyl- line	39

RESULTATS (Suite)

- | | |
|--|----|
| 2. Action de l'ouabaine sur la glycogénolyse et la
glycolyse dans le diaphragme | 39 |
| 3. Interaction de l'ouabaine et des catécholamines | 42 |

<u>DISCUSSION</u>	43
-------------------	----

<u>EXPERIENCES IN VIVO</u>	51
----------------------------	----

<u>METHODES</u>	53
-----------------	----

- | | |
|--|----|
| - Protocole expérimental | 53 |
| - Perfusion d'ouabaine | 55 |
| - Mesures physiologiques: pression artérielle, pouls | 56 |
| pH, pCO ₂ , bicarbonate | 56 |
| - Mesures biochimiques: électrolytes | 57 |
| glucose | 57 |

<u>RESULTATS</u>	59
------------------	----

- | | |
|----------------------------|----|
| - Effets cardiovasculaires | 59 |
| - Effets métaboliques | 59 |

<u>DISCUSSION</u>	69
-------------------	----

<u>CONCLUSION</u>	75
-------------------	----

<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	81
----------------------	----

ABREVIATIONS

A	Adrénaline
ADP	Adénosine diphosphate
AGL	Acides gras libres
AMP	Adénosine monophosphate
C-AMP	3',5'-Adénosine monophosphate cyclique
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	Adénosine triphosphatase
CA	Catécholamines
DBA	Dibutyryl-3', 5'-AMP cyclique
DG	Diglycéride
F-6-P	Fructose 6-phosphate
F-1-6-P	Fructose 1-6-phosphate
G-1-P	Glucose 1-phosphate
G-6-P	Glucose 6-phosphate
G-6-PDH	Déhydrogenase du G-6-P
GDM	Déhydrogénase du glycérol 1-phosphate
GK	Glycérokinase
i.m.	intra-musculaire
i.p.	intra-péritonéal
ISO	Isoprotérénol
i.v.	intra-veineux
KRP	Krebs-Ringer phosphate
LDH	Déhydrogénase de l'acide lactique
M	Monoglycéride

NA	Noradrénaline
NAD	Nicotinamide adénine dinucleotide
NADH	Nicotinamide adénine dinucleotide réduit
NADP	Nicotinamide adénine dinucleotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adénine dinucleotide phosphate réduit
O	Ouabaine
PEP	Acide phosphoénolpyruvique
PGI	Phosphoglucosomérise
PGluM	Phosphoglucomutase
PK	Pyruvatekinase
Pi	Phosphate inorganique
TG	Triglycéride
TGL	Triglycéride lipase
V	Concentration en glycérol

INTRODUCTION

Au XVIII^e siècle, les propriétés cardiotoniques de l'ouabaine et autres glucosides cardiotoniques étaient déjà connues. Son action fonctionnelle sur le myocarde fut étudiée en détails. Toutefois l'action de l'ouabaine et des glucosides cardiotoniques à l'échelle cellulaire n'a été étudiée que récemment, dans des systèmes in vitro. Ces études ont porté sur l'influence de ces composés, en forte concentration (10^{-4} à 10^{-6} M), sur le transport ionique actif et leurs effets métaboliques. Nous rappellerons brièvement, dans la première partie, les travaux concernant le transport ionique actif et le transport d'autres substances. Les actions métaboliques propres étant l'objet du présent travail, nous en présenterons les divers éléments nécessaires à la compréhension des résultats et qui nous ont guidés dans leur interprétation.

Avant de présenter notre étude, nous ferons un rappel rapide des différents mécanismes qui y sont impliqués.

1. Action pharmacologique des glucosides cardiotoniques.

A. Action sur le transport actif.

Ussing (1949) établit que l'équilibre ionique à travers la membrane cellulaire est maintenu par un transport actif des ions Na et K en direction opposée. A la suite de ces

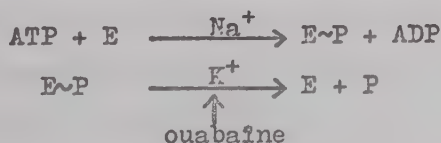
travaux, Schatzmann (1953), puis Glynn (1957) montrèrent dans des érythrocytes que l'ouabaine, la digitoxine et leurs aglucones, en faible concentration, sont des inhibiteurs spécifiques du transport ionique actif. De nombreux travaux ultérieurs décrivirent l'action de divers glucosides cardiotoniques sur la pompe sodium-potassium dans les érythrocytes (Glynn 1957, Kahn-Acherson 1955, Joyce 1955), le muscle strié (Conway 1961), le muscle cardiaque (Holland 1959, Rayner 1957, Tuttle 1961), la musculature lisse de l'intestin (Godfraid 1962) et de l'utérus (Daniel 1960), la vessie (Diamond 1962), les reins (Wilde 1960, Cade 1961, Strickler 1961, Whittam 1963).

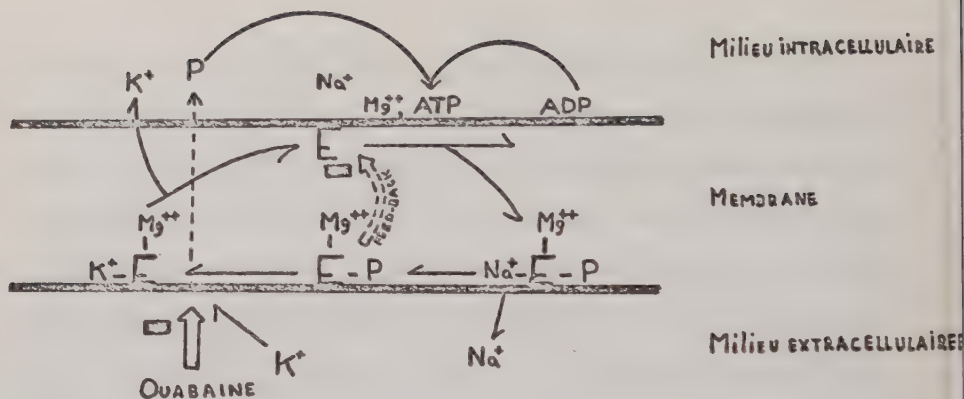
Action sur l'ATPase membranaire.

Skou (1957-1960) décrivit une ATPase isolée du nerf de crabe. Cette ATPase est située dans la membrane cellulaire (Hazon 1959); elle utilise l'ATP spécifiquement comme substrat; son activité, qui dépend de la présence d'ions Mg, est stimulée par les ions Na et K; elle est inhibée par les glucosides cardiotoniques. Cette ATPase est très répandue dans toutes les espèces animales et elle a été identifiée dans de nombreux tissus (Bonting 1961), parmi lesquels les érythrocytes (Post 1960, Hoffman 1960, Dunham et Glynn 1961), le muscle strié (Skou 1962), le muscle cardiaque (Auditore 1962, Yu 1962, Schwartz 1962, 1966), le rein (Whittam 1961, Skou 1962, Taylor 1963, King-Solwig 1963), le nerf (Bonting 1962).

La distribution de cette enzyme et ses propriétés, en particulier sa très grande sensibilité aux glucosides cardiotoniques, permirent d'émettre l'hypothèse que l'ATPase membranaire participerait au transport ionique actif et en serait le transporteur (Skou 1957). Il existe en effet une relation étroite entre l'effet inhibiteur des glucosides cardiotoniques sur le transport actif et l'activité enzymatique correspondante (Whittam 1962, Dunham 1961, Post 1960). Glynn (1957) et Whittam (1958) avaient d'ailleurs suggéré que l'entrée du potassium et la sortie du sodium étaient liés à un mécanisme de transport actif, utilisant l'ATP comme source d'énergie.

L'ATPase est probablement un système de plusieurs enzymes, participant à l'hydrolyse de l'ATP (Skou 1964, Judah et Ahmed 1964). Ce complexe enzymatique se composerait d'au moins deux "activités": l'une catalysant le transfert du γ -phosphate de l'ATP, riche en énergie, à un intermédiaire (phosphoprotéine (Charnock 1963) ou lipoprotéine (Skou 1964)) et une deuxième catalysant l'hydrolyse de cet intermédiaire phosphorylé et libération de phosphate inorganique; la première réaction est stimulée par Na^+ , la seconde par K^+ (Post 1962, 1965, Ahmed et Judah 1965, Garrahan 1967); la formation d'un intermédiaire phosphorylé est cependant encore discutée (Skou 1965, Schwartz 1968, Albers 1967).





Schema 1. Représentation du mécanisme d'action possible de l'ouabaine sur la Na^+ , K^+ -ATPase.

Le mode d'action des glucosides cardiotoniques sur l'ATPase membranaire n'est pas clair. Aussi bien dans le système enzymatique intact qu'isolé, il existe une étroite relation entre l'action des glucosides et celle de l'ion potassium: l'ATPase, en milieu sans K^+ ou en présence d'ouabaine, perd son activité; l'action inhibitrice de l'ouabaine peut être compensée en augmentant la concentration du milieu en K^+ (Dunham 1961, Auditore 1964). Ces observations pourraient indiquer une action compétitive entre ouabaine et ion potassium; une analyse cinétique de l'interaction de l'ouabaine et de l'ion potassium démontre qu'il ne s'agit pas d'une simple compétition (Glynn 1964, Matsui 1966 a). L'inhibition par les glucosides cardiotoniques paraît plutôt liée à une modification allostérique de l'enzyme (Hoffmann 1966, Schwartz 1968).

Plusieurs chercheurs ont montré qu'en présence d'ouabaine il y a accumulation de l'intermédiaire phosphorylé (Charnock 1963, Post 1967, Albers 1967); l'ouabaine, en le stabilisant, en inhiberait la déphosphorylation (Matsui 1968 a), catalysée par l'ion potassium.

Tous les glucosides cardiotoniques actifs, ayant un anneau lactone non-saturé en α en C₁₇, en position α, β , un groupe hydroxyl libre en C₁₄ et estérifié en C₃ sont des inhibiteurs de la Na⁺, K⁺-ATPase.

Action sur le taux intracellulaire du potassium et du calcium.

a. Potassium.

La diminution du K⁺ intracellulaire (K⁺i) observée en présence d'ouabaine ou d'autres glucosides cardiotoniques pourrait être une conséquence directe de l'inhibition du transport ionique actif et de l'ATPase membranaire. Les changements de K⁺i furent étudiés principalement dans le myocarde (Lee 1961, Conn 1956, Rayner 1957, Muller 1965, Carmeliet 1967, Regan 1956), mais aussi dans les érythrocytes (Schatzmann 1953, Joyce 1955, Glynn 1957), dans le muscle strié (Gourley 1964, Weissler 1964), dans le foie (Lown 1960). Une augmentation du potassium plasmatique (Kelly 1961) et urinaire (Ramsey 1967) a été rapportée.

b. Calcium.

Clark en 1912 déjà avait remarqué que l'action de l'ouabaine sur le muscle cardiaque était liée à la présence de calcium.

Récemment de nombreux travaux ont étudié l'action des glucosides cardiotoniques sur le calcium intracellulaire. L'ouabaine augmenterait l'entrée du calcium dans la fibre musculaire cardiaque (Grossmann 1964, Wilbrandt 1954, Nayler 1967) et dans le muscle strié (Winegrad 1962). L'action de l'ouabaine sur les mouvements du calcium dans le reticulum sarcoplasmique a été le sujet de nombreuses études, mais n'est toujours pas clairement comprise (Lee 1966, Caprio 1967, Entman 1969). Ces effets des glucosides cardiotoniques sur les mouvements de calcium sont-ils dus à une action directe comparable à celle exercée sur le transport du sodium et du potassium ou sont-ils une conséquence de l'augmentation de la perméabilité membranaire, secondaire à l'inhibition de l'ATPase membranaire ?

En modifiant les mouvements du calcium, l'ouabaine stimulerait la libération de substances mises en réserve dans certaines glandes (Rasmussen 1968). Le calcium est en effet le stimulus de nombreuses sécrétions (Douglas 1963, Randic 1967). L'ouabaine augmente la sécrétion de catécholamines par les glandes surrénales, l'absence de calcium inhibe ce mécanisme (Banks 1967).

Enfin Fassina (1967) a rapporté que le calcium modifiait l'effet de l'ouabaine sur la lipolyse.

Glucosides cardiotoniques et transport du glucose.

Se référant à cette propriété particulière aux glucosides cardiotoniques, de nombreux travaux ont étudié leur action sur le transport actif de certaines substances: acides aminés, glucose (Csáky 1961, 1963, Bihler 1968).

L'ouabaine diminue l'absorption du glucose au niveau de l'intestin et des reins (Gordon 1965, Csaky 1965 a,b), tandis que dans le muscle strié et dans le tissu adipeux les résultats sont contradictoires. Bihler (1968), dans le diaphragme et Ho (1967), dans le tissu adipeux, observèrent, in vitro, une augmentation de la prise du glucose, tandis que Clausen (1965) n'observa pas de changement dans le muscle strié et Kujalova (1966), une légère baisse dans le tissu adipeux. L'absorption rénale ou intestinale du glucose semble liée à l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase; dans le muscle strié ou le tissu adipeux, il s'agit probablement d'un autre mécanisme.

B. Action métabolique de l'ouabaine.

L'ouabaine semble agir sur le métabolisme intermédiaire comme une drogue anabolique; plusieurs auteurs ont comparé son activité métabolique à celle de l'insuline (Clausen 1966), par opposition à celle des catécholamines (Ho 1967 b).

Sur le tissu musculaire, Clausen (1965) observa une augmentation de la synthèse du glycogène à partir de ^{14}C -glucose in vivo et in vitro; la production d'acide lactique diminue d'une manière réciproque, ainsi que l'oxydation du glucose,

par rapport au contrôle sans ouabaine.

Sur le tissu adipeux, l'ouabaine a un effet antilipolytique propre et inhibe l'action lipolytique des catécholamines (Mosinger 1966, Kypson 1968 a, b, Ho 1966, 1967 b). L'ouabaine modifie également le métabolisme du glucose dans ce tissu: elle augmente la glycogénèse et diminue la glycogénolyse; elle augmente le shunt des pentoses (Ho 1967 a).

Ho observa encore que l'ouabaine diminuait l'activité de l'adenyl cyclase dans un homogénat de tissu adipeux et Fassina (1967) rapporta qu'à faibles doses (10^{-5} - 10^{-6} M), la digitoxine inhibait compétitivement la lipolyse stimulée par la noradrénaline.

Clausen (1966) et Ho (1967 b) obtinrent des résultats similaires en incubant le tissu dans un milieu ne contenant pas de potassium; ils proposèrent que les changements métaboliques observés seraient liés à une action de l'ouabaine sur le transport actif.

Dans toutes les expériences in vitro les doses d'ouabaine étaient comparables (10^{-4} - 10^{-6} M).

2. But de ce travail.

En présence des données actuelles, notre étude se propose de clarifier les effets métaboliques de l'ouabaine, à une dose similaire (10^{-4} - 10^{-6} M) à celle interférant avec la Na^+ , K^+ -ATPase. Notre étude s'est proposée de répondre aux questions suivantes:

1. Quels sont les effets de l'ouabaine sur la lipolyse, et plus particulièrement, quelle est la nature de l'interaction de l'ouabaine sur les effets métaboliques des catécholamines dans le tissu adipeux;
2. Quels sont les effets de l'ouabaine sur la glycogénolyse et la glycolyse; nous avons cherché à localiser et préciser l'action de ce glucoside sur quelques enzymes-clefs du métabolisme glucidique, en étudiant les effets de l'ouabaine sur certains métabolites intermédiaires;
3. Quels sont les rapports entre les actions de l'ouabaine *in vitro* et *in vivo*. Ces actions *in vivo* peuvent-elles s'expliquer par les mêmes mécanismes que ceux observés *in vitro* ?

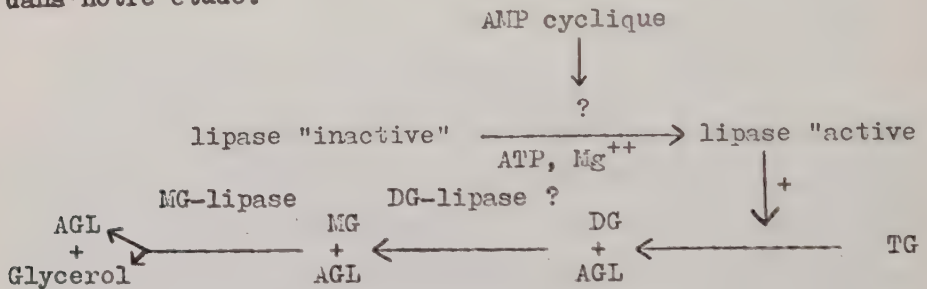
3. Les systèmes enzymatiques du métabolisme glucidique et lipidique se rapportant à notre étude.

A. Les lipases.

Les lipides, mis en réserve dans le tissu adipeux, sont remis en circulation sous forme d'acides gras libres (AGL), qui sont transportés dans le sang liés à l'albumine (Dôle 1956, Gordon 1956). Les catécholamines et d'autres hormones (ACTH, glucagon, TSH) stimulent la libération des acides gras libres dans différentes espèces (Rizack 1961, Hollenberg 1961). Le tissu adipeux contient plusieurs lipases (Mann 1966). L'hydrolyse des triglycérides à longue chaîne est due à, au moins, deux enzymes: 1) la triglycéride lipase (TGL) (Gorin 1964) ou lipase hormono-sensible; elle se trouve dans les microsomes; l'activité de cette enzyme est l'étape limitante de la lipolyse (Strand 1964). En présence d'ATP et d'ions Mg, l'AMP cyclique augmente l'activité de la TGL (RIZACK 1964, Butcher 1967), transformant la lipase inactive en lipase active, directement ou par l'intermédiaire d'une autre enzyme. 2) la monoglycéride lipase (Vaughan 1964): son activité n'est pas modifiée par les hormones. La diglycéride lipase n'a pas encore été identifiée, elle agirait simultanément avec la monoglycéride lipase.

Il existe dans le tissu adipeux une autre triglycéride lipase: la lipo-protéine lipase (Brady 1967). Elle est

présente dans les parois des vaisseaux du tissu adipeux et hydrolyse les triglycérides des chylomicrons: elle participe à la mise en réserve des lipides. Seule l'activité de la lipase hormono-sensible joue un rôle **important** dans notre étude.



B. Phosphorylase, synthétase du glycogène et phosphofructokinase.

Le métabolisme glucidique est contrôlé par certaines enzymes-clefs: le métabolisme du glycogène est sous le contrôle direct de la phosphorylase et de la synthétase du glycogène; la glycolyse est principalement sous le contrôle de la phosphofructokinase. L'activité de ces enzymes est réglée par les métabolites intermédiaires, les hormones, la composition ionique du milieu, le pH; elles répondent aux mêmes stimuli métaboliques ou hormonaux. Elles se trouvent dans la fraction soluble de la cellule.

La phosphorylase.

La phosphorylase catalyse la conversion du glycogène en glucose; l'activité de cette enzyme est l'étape limitante de la glycogénolyse (Sutherland et Cori 1951). La

phosphorylase existe sous deux formes: "a" active et "b" inactive (c'est-à-dire moins active). La forme "b" est convertie en "a" par la phosphorylase-b-kinase en présence d'ATP: la phosphorylase "a" est reconvertie en "b" par la phosphorylase-phosphatase. La concentration de la forme "a" représente un équilibre entre l'inactivation par la phosphorylase-phosphatase et l'activation par la phosphorylase-kinase; lors de l'inactivation il y a libération d'orthophosphate inorganique (P_i), tandis que l'activation demande de l'ATP et des ions Mg (Wosilait 1956, Rall 1956 b). Toutes deux, ainsi que leur rapport, jouent un rôle principal dans le contrôle de la glycogénolyse. Indépendamment de la régulation spécifique par la phosphorylase-b-kinase, l'activation de la phosphorylase "b" est réglée par les métabolites; le 5'-AMP et l'orthophosphate inorganique la stimulent, tandis qu'un excès d'ATP et de G-6-P l'inhibent (Parmeggiani 1962, Morgan 1964 II, III).

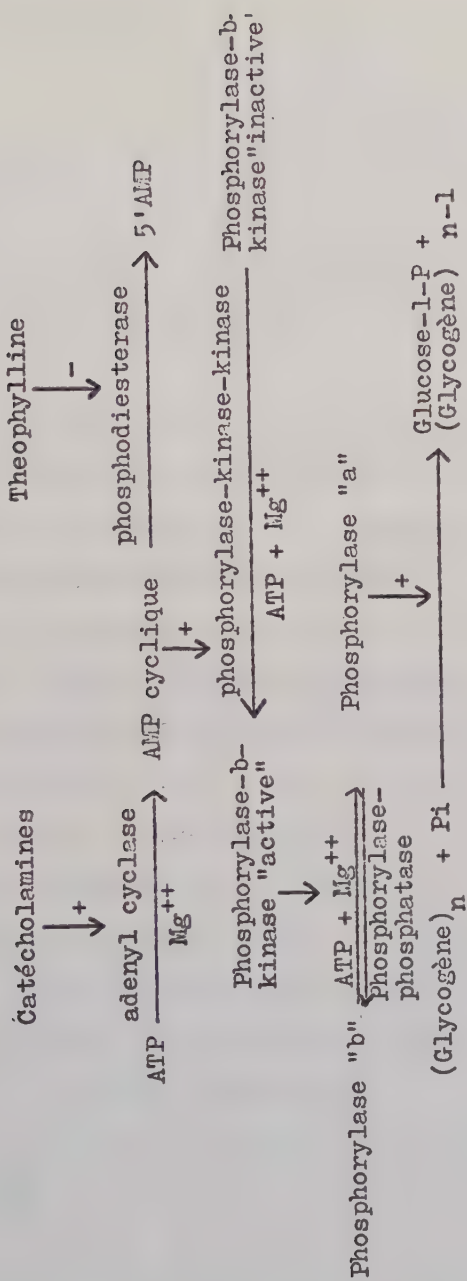
L'adrénaline et le glucagon stimulent la formation de la forme active "a" en présence d'ATP et d'ions Mg (Sutherland 1951, Fisher 1955, Rall 1956 a). L'adrénaline n'agit pas directement sur la phosphorylase, mais favorise la formation d'AMP cyclique (Rall 1957, Sutherland 1958). L'AMP cyclique, par l'intermédiaire de la phosphorylase-kinase-kinase, stimule l'activation de la phosphorylase-b-kinase, qui, à son tour, catalyse la conversion de la phosphorylase "b" en "a" (Krebs 1964, 1966, Delange 1968, Walsh 1968).

Un taux élevé de glycogène (Danforth 1965) et les ions calcium (Krebs 1959) favorisent aussi la phosphorylation de la phosphorylase-b-kinase.

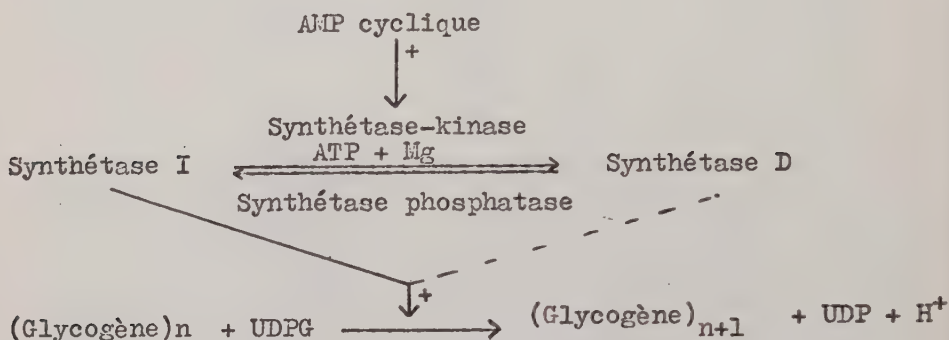


La synthétase du glycogène.

La réaction catalysée par cette enzyme contrôle la glycogénèse (Larner 1966). Elle existe également sous deux formes: "D" dépendante de la concentration en G-6-P et "I" indépendante du G-6-P, beaucoup plus active que la forme "D" (Friedman 1962). La conversion d'une forme à l'autre dépend de l'activité de deux enzymes: la synthétase-kinase catalysant la conversion de "I" en "D", et la synthetase-phosphatase de "D" en "I". L'activité de la synthétase-kinase est contrôlée par les hormones, principalement les catécholamines et l'insuline; activée par l'AMP cyclique, elle catalyse la phosphorylation de la synthétase "I" en

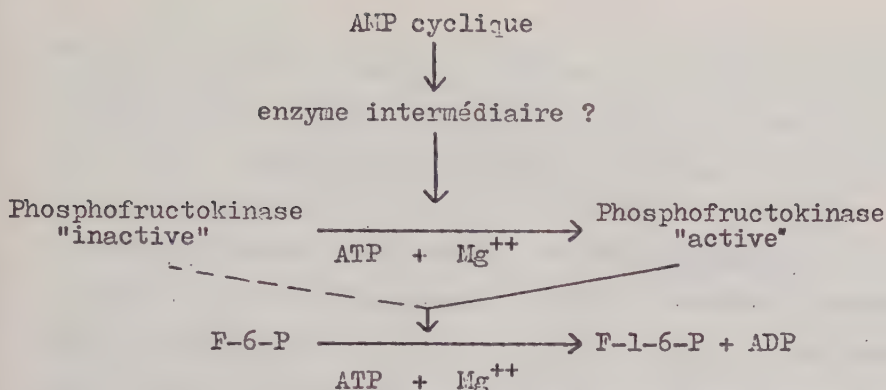


"D" en présence d'ATP et d'ions Mg (Huijing 1966, Rosell-perez 1964).



Phosphofructokinase.

L'activité de la phosphofructokinase détermine la vitesse de la glycolyse. Il existe également une forme inactive et une forme active de cette enzyme. L'activité de la phosphofructokinase inactive est le résultat de la concentration de nombreux métabolites, activateurs et inhibiteurs; elle est activée par les nucléotides, dont le 5'AMP et l'ATP, ce dernier jouant un double rôle, par le F-6-P, F-1-6-P, Pi, K⁺; elle est inactivée par le citrate et l'ATP en forte concentration (Passonneau 1962, 1963). La forme active est prédominante en présence d'AMP cyclique ou d'ions Ca (Mansour 1962, 1963); il existe un équilibre entre les deux formes, modifié suivant les conditions (métabolites, pH, AMP cyclique, ATP) (Mansour 1965). L'activation de la phosphofructokinase demande de l'ATP et des ions Mg; une enzyme, activée par l'AMP cyclique, participe probablement à ce mécanisme (Stone 1967).



C. Le système activateur des enzymes lipolytiques et glycolytiques.

L'étude du mécanisme de l'action hyperglycémique de l'adrénaline et du glucagon a conduit Sutherland à isoler dans un homogénat de foie un facteur stable à la chaleur, stimulant l'activité de la phosphorylase et s'accumulant en présence d'adrénaline. Il fut cristallisé et identifié comme étant l'acide adénosine -3'-5'-monophosphorique (ou AMP cyclique) (Ball 1957, Sutherland 1958).

L'AMP cyclique est le médiateur des effets métaboliques des catécholamines (Sutherland 1960), ainsi que de nombreuses autres hormones. Le nucléotide modifie non seulement l'activité de systèmes enzymatiques, mais aussi la perméabilité cellulaire et la sécrétion glandulaire (HCl, insuline) (Robison 1968).

La concentration intracellulaire d'AMP cyclique dépend de l'activité d'au moins deux enzymes: l'adényl cyclase

qui convertit l'ATP en AMP cyclique en présence de Mg^{++} et la phosphodiesterase, qui transforme l'AMP cyclique en 5'-AMP (Sutherland 1958, 1962, Rall 1958).

L'adényl cyclase se trouve dans presque tous les tissus (Sutherland 1962). Elle est localisée dans la membrane cellulaire (Davoren 1963, Rodbell 1967) et dans certaines structures membranaires intracellulaires, tel le reticulum sarcoplasmique (Rabinowitz 1965). Dans la plupart des tissus, l'adényl cyclase montre un haut degré de spécificité par rapport au stimulus hormonal (Sutherland 1960); dans le tissu adipeux, au contraire, un grand nombre d'hormones stimule la formation d'AMP cyclique (Butcher 1966). Sutherland et coll. (Robison 1967) ont proposé un modèle théorique de l'adényl cyclase: elle serait composée de deux unités, l'une régulatrice, dirigée vers le milieu extracellulaire, l'autre catalyseur, dont le centre actif est en contact avec le milieu intracellulaire. L'hormone agirait sur l'unité régulatrice, élément variable du système et récepteur de l'hormone; l'unité catalyseur serait la même dans tous les tissus. La nature de l'adényl cyclase (une seule enzyme ou un système d'enzymes) et son mécanisme d'action ne pourront être compris que lorsqu'il sera possible de l'obtenir sous une forme tout-à-fait pure.

Les effets des catécholamines ont été classés en

deux groupes α et β , classification arbitraire, basée sur la réponse d'un tissu ou d'un organe aux différentes amines sympathiques et aux bloqueurs adrénergiques, d'où deux groupes de récepteurs: α et β (Ahlquist 1948). Les effets métaboliques des catécholamines sont généralement considérés comme β ; les catécholamines stimulent l'activité de l'adényl cyclase, alors que les β -bloqueurs, tels le dichlorisoprotérenol ou le pronéthanol, en diminuent l'activité dans divers tissus; ce problème fut étudié plus particulièrement dans le tissu adipeux et dans les cellules isolées de ce tissu (Butcher 1967, 1968, Wenke 1966). Ces observations ont conduit Sutherland et ses collaborateurs (Robison 1967) à considérer l'adényl cyclase comme un récepteur adrénergique.

La phosphodiesterase: l'AMP cyclique est dénaturé par une phosphodiesterase spécifique, qui l'hydrolyse en 5'-AMP (Sutherland 1958, Butcher 1962). Elle est encore plus largement répandue que l'adényl cyclase, et se trouve dans la fraction soluble et les particules. Les méthylxanthines sont des inhibiteurs compétitifs; c'est par ce mécanisme que la théophylline potentialise l'action des catécholamines.

ETUDE IN VITRO

METHODES

1. Lipolyse.

Incubation du tissu adipeux.

Des rats Sherman mâles, pesant de 150-250 g (Jelinkova 1963), ayant libre accès à la nourriture, furent anesthésiés avec du pentobarbital sodique (60 mg/kg i.p.) 30 minutes avant d'être décapités. Le tissu adipeux épiddymaire est aussitôt prélevé, émincé et incubé dans un soluté de Krebs-Ringer phosphate (KRP) contenant 5% d'albumine bovine, fraction V, pH 7,4, à 37°C pendant 2 heures dans un bain-marie avec agitateur, la phase gazeuse étant l'air. Le rapport tissu-milieu est 1:20. L'albumine sert de récepteur des acides gras libres (AGL), prévenant leur accumulation à l'intérieur de la cellule et une inhibition de la lipolyse par un mécanisme de "feed-back" (Vaughan 1964, Himms-Hagen 1967).

Le milieu est préparé selon Umbreit (1957), mais notre solution ne contient que la moitié de la quantité de calcium prescrite, afin de prévenir un précipité de phosphate de Ca^{++} :

$9,10 \times 10^{-3} \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $1,28 \times 10^{-3} \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, $0,128 \text{ mM NaCl}$,
 $5,12 \times 10^{-3} \text{ mM KCl}$, $1,28 \times 10^{-3} \text{ mM MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$,
 $1,37 \times 10^{-3} \text{ mM CaCl}_2$ per ml.

Mesures biochimiques.

Le glycérol, libéré dans le milieu avec les AGL, est utilisé comme index de la lipolyse; le tissu adipeux ne contenant pas de glycérokinase (GK), le glycérol ne peut pas être resynthétisé dans ce tissu, ce qui est le cas des AGL (Shafrir 1960, Vaughan 1962).

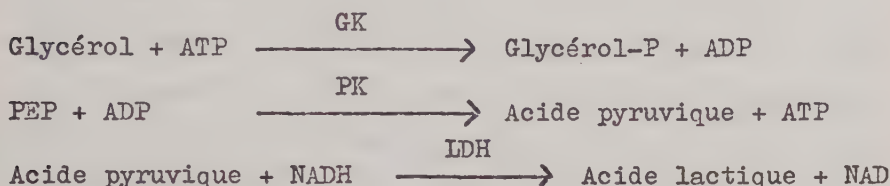
Le glycérol est mesuré :

soit colorimétriquement selon Lambert et Neish (1950); le principe de la réaction est le suivant : le glycérol est oxydé quantitativement en formaldéhyde par l'acide periodique, dont l'excès est réduit en iodure par l'arsénite de sodium; la formaldéhyde formée réagit avec l'acide chromotrope (acide 4,5-dihydroxy 2,7-naphtalène disulfonique), sous forme de sel disodique, en solution sulfurique, pour former un composé coloré, ayant une absorption maximale à 570 mμ; l'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration, dans les limites de l'expérience.

A la fin de l'incubation 0,5 ml du milieu est immédiatement déprotéinisé dans de l'acide trichloracétique en solution à 10% et un aliquot du surnageant utilisé pour la mesure;

soit enzymatiquement, selon la méthode de Boehringer (test N° TC-GL 15989):

A la fin de l'incubation, un aliquot du milieu est gardé à basse température jusqu'au moment de la détermination du glycérol.



Pour chaque molécule de glycérol, une molécule de NADH est oxydée.

Le pool d'ATP est constant, étant régénéré à mesure: 1 mole de glycérol utilise 1 mole d'ATP, la formation d'une mole d'ATP à partir de PEP et ADP produit une mole d'acide pyruvique qui, à son tour, utilise une mole de NADH.

Système: 0,5 ml. milieu + 2,5 ml. d'une solution tampon de triéthanolamine 0,1 M pH 7,6 contenant MgSO_4 0,004M + 0,05 ml. d'une solution contenant :

ATP 0,033 M, PEP 0,011 M, NADH 0,006 M + 0,01 ml. LDH.

Lire E_1 à 340 mμ.

Ajouter 0,01 ml. PK. Lire E_2 après 10 minutes.

La différence $E_1 - E_2$ est comparée avec celle de solutions standard de glycérol, contenant 5-10 μm de glycérol.

L'ouabaine à la concentration de 10^{-4} réagit légèrement avec la méthode colorimétrique; ceci est probablement dû à la partie glucosidique de la molécule d'ouabaine. Pour

corriger cette interférence, la densité optique de tous les échantillons contenant l'ouabaine sont lus par rapport à une solution de référence contenant la même concentration d'ouabaine et ayant subi le même traitement. La correction **est** contrôlée avec la méthode enzymatique; les résultats obtenus avec les deux méthodes sont tout-à-fait concordants.

2. Métabolisme des glucides.

Incubation du diaphragme.

Des rats Sherman mâles, jeûnant depuis 24 h., furent anesthésiés au pentobarbital de sodium (60 mg/kg i.p.) et décapités 30 minutes plus tard. Le diaphragme est immédiatement prélevé et préincubé dans du soluté physiologique à 4°C; le muscle, nettoyé de tout tissu connectif ou adipeux, est coupé en 4 parties égales, pesé et incubé dans le soluté de Krebs-Ringer phosphate décrit ci-dessus, contenant 200 mg % de glucose, pH 7,4, à 37°C pendant une heure dans un bain-marie modèle Dubnoff, avec 25% O₂ équilibré avec de l'azote comme phase gazeuse. Le rapport tissu-milieu est 1:40. L'une des parties du diaphragme sert de contrôle, les autres sont incubées avec les drogues étudiées.

Mesures biochimiques.

Glycogène.

A la fin de l'incubation, le muscle fut rapidement immergé dans une solution d'acide sulfurique 4N, puis lavé dans de l'eau distillée; le tissu fut ensuite digéré dans 1 ml. d'hydroxyde de potassium à 30% dans un bain-marie bouillant pendant une heure; le glycogène, précipité avec 5 ml. de méthanol, est séparé et dissout dans un volume (2 ml.) d'eau distillée déterminé selon la concentration du tissu en glycogène.

Le glycogène est alors mesuré colorimétriquement selon la méthode de Seifter et al. (1950) dans 0,6 ml. de l'extrait aqueux auquel est ajouté 3,0 ml. de réactif. Le réactif est une solution d'anthrone à 0,1% dans de l'acide sulfurique à 80%; l'acide sulfurique deshydrate la molécule de sucre avec formation d'un dérivé furfural qui, par condensation avec l'anthrone, donne en chauffant dans un bain-marie bouillant une coloration verte. La densité optique, mesurée dans un spectrophotomètre à 620 mμ, est proportionnelle à la concentration. Les résultats sont exprimés en unités de glucose.

Métabolites intermédiaires.

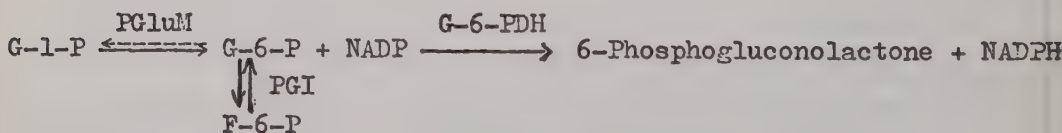
Pour la mesure des métabolites intermédiaires, le muscle fut immédiatement congelé à la fin de l'incubation dans de l'azote liquide, et conservé dans de la neige carbonique, jusqu'à homogénéisation. Le tissu congelé est

pesé rapidement, homogénéisé dans HClO_4 0,6 N (1:10 ou 1:20) et centrifugé à 5000 rpm, pendant 10 minutes; le volume du surnageant est mesuré et titré avec K_2CO_3 5 N à un pH alcalin en utilisant le rouge du phénol comme indicateur. Toutes les opérations sont faites à basse température ($0^\circ - 4^\circ \text{C}$).

Les métabolites intermédiaires sont déterminés enzymatiquement. Utilisant le métabolite à déterminer comme substrat de la réaction, nous suivons les réactions enzymatiques de la glycolyse aboutissant à un changement en NADH ou NADPH; le noyau pyridine réduit de ces deux coenzymes a une absorption spécifique à 340 m μ , proportionnelle à la concentration. Les mesures furent faites dans un spectrophotomètre DB; la chambre contenant les cuvettes fut maintenue à température constante (24°C) à l'aide d'un thermostat.

Glucose-6-phosphate (G-6-P), glucose-1-P (G-1-P), fructose-6-P (F-6-P). (Bergmeyer 1963, p.131 - 134).

Ces trois métabolites peuvent être mesurés en une seule chaîne de réactions:



Système.

0,9 ml. solution tampon de triéthanolamine 0,05 M, pH 7,6,
 + 0,1 ml. MgSO_4 0,1 M + 0,1 ml. EDTA 0,02 M + 0,03 ml. NADP
 20 mg/ml. + 0,5 ml. échantillon déprotéinisé. Première lecture E_1 .

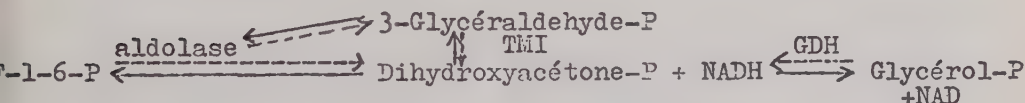
Ajouter 0,01 ml. déshydrogénase du G-6-P (G-6-PDH)
(1 mg. protéine/ml.); lire E2 lorsque la réaction est terminée (~3 minutes).

Ajouter 0,01 ml. phosphoglucomutase (PGLuM)
(2 mg. protéine/ml.): E3

Ajouter 0,01 ml. phosphoglucoisomérase (PGI)
(0,2 mg. protéine/ml.): E4

La différence E1-E2 permet de calculer la teneur en G-6-P,
E2-E3 en G-1-P, E3-E4 en F-6-P.

Fructose-1-6-phosphate (F-1-6-P) (Bergmeyer 1963, p.246).



La réaction totale est en faveur de la formation du phosphate de glycérol:

Système.

1,0 ml. solution tampon de triéthanolamine 0,4 M, pH 7,6

0,01 ml. NADH 4 mg./ml.

0,5 ml. échantillon déprotéinisé

0,05 ml. dehydrogénase du glycérol-1-P (GDH)

(1,5 mg. protéine/ml.): E1

Ajouter simultanément 0,01 ml. triosephosphate isomérase
(20 mg./ml.) (TIM) + 0,01 ml. aldolase (2 mg. protéine/ml.).

Lire E2 après 5 minutes.

La différence E1 - E2 permet de calculer la teneur en F-1-6-P.

La concentration en F-1-6-P étant très basse, la mesure fut faite au spectrofluomètre (Excitation 340 mμ, émission 456 mμ), 100 fois plus sensible que le spectrophotomètre.

Dans toutes ces déterminations enzymatiques, il faut prendre garde de ne commencer la réaction qu'après s'être assuré que la valeur initiale est stable.

Calcul de la concentration.

Etant donnée la densité optique, la concentration du métabolite dans l'échantillon est calculée sur la base de la loi de Lambert-Beer. Dans toutes les réactions, sauf F-1-6-P, il y a formation ou utilisation d'une μM de NADH ou NADPH par μM de substrat, pour le F-1-6-P 2 μM de NADH sont formées par μM de F-1-6-P. Le coefficient d'extinction de 1 μM de NADH ou NADPH est de 6,22; nous utilisons la formule:

$$\frac{\mu\text{M/mg ou g}}{\text{tissu}} = \frac{\text{OD} \times V \times f}{6,22 \times d \times v} \times \frac{V_t}{P}$$

OD = densité optique

V = volume total dans la cuvette

v = volume de l'échantillon

f = facteur de dilution (Homogénéisation et neutralisation)

d = chemin de la lumière = 1 cm.

V_t = volume total de l'échantillon

P = poids de l'échantillon en mg ou g.

Glucose, lactate, pyruvate.

Le glucose, le lactate et pyruvate furent déterminés dans un aliquot du milieu après précipitation des protéines par l'acide perchlorique 0,6 N (1+2) pour le lactate et pyruvate, par l'hydroxyde de barium, dont l'excès est neutralisé par du sulfate de zinc pour le glucose.

Glucose (Saifer 1958).

Glucose + O₂ + H₂O $\xrightarrow{\text{glucose oxydase}}$ H₂O₂ + acide gluconique

H₂O₂ + chromogène réduit $\longrightarrow$ chromogène oxydé + H₂O

Pour des concentrations de 100-300 mg% de glucose, 1,0 ml. de Ba (OH)₂.8 H₂O, 1,8% + 1,0 ml. ZnSO₄.7H₂O, 2% sont ajoutés successivement à 0,1 ml. de l'échantillon dilué dans 2,0 ml. d'eau. Après centrifugation, 2,0 ml. de réactif (enzymes + chromogène) sont ajoutés à intervalles réguliers à 2,0 ml. du surnageant ; la réaction est arrêtée par une goutte de HCl 4N après exactement 10 minutes. L'intensité de la coloration est déterminée spectrophotométriquement à 400 mμ; elle est proportionnelle à la concentration.

Lactate - Pyruvate.

Lactate + NAD $\xrightleftharpoons{\text{LDH}}$ Pyruvate + NADH

Lactate (Boehringer test N°. 15972).

A 2,0 ml. de solution tampon de glycine 0,5 M, pH. 9,0, sont ajoutés successivement:

0,01 ml. de déshydrogénase de l'acide lactique (LDH) (2 mg./protéine)

0,03 ml. NAD 0,027 M

0,10 ml. de l'échantillon déprotéinisé.

Laisser reposer 30 minutes à température ambiante (25°C) et lire la densité optique par rapport à un système contenant 0,1 ml. d'acide perchlorique au lieu de l'échantillon.

Pyruvate (Boehringer test No. 15973).

A 0,5 ml. de solution tampon de phosphate dipotassique 1,1 M pH 7,0, sont ajoutés 1,5 ml. de l'échantillon déprotéinisé; l'excès d'acide perchlorique est alors précipité et séparé par centrifugation. Ajouter à 1,5 ml. du surnageant, dont la densité optique E_1 fut mesurée: 0,01 ml. NADH 0,012 M + 0,01 ml. LDH.

Après 3 minutes, la réaction est terminée: E_2 . La différence $E_1 - E_2$ permet de calculer la teneur en acide pyruvique.

Mesure de la consommation d'oxygène par le tissu.

Dans un groupe d'expériences, le tissu fut incubé dans un appareil de Warburg, à 37°C . La fiole contenant le muscle et le milieu est saturée par un mélange de 25% O_2 et 75% N_2 ; après une période d'équilibration de 10 minutes, la consommation d'oxygène est enregistrée toutes les 10 minutes pendant une heure. Le CO_2 formé est absorbé par une solution normale de KOH, se trouvant dans un bras de la fiole et la consommation en oxygène du tissu est calculée d'après les différences manométriques observées entre le début et la fin de l'incubation (Umbreit 1957).

3. Expression des résultats.

Les valeurs des résultats représentent la moyenne d'un certain nombre d'expériences (N), plus ou moins l'erreur standard. Les intervalles de confiance sont calculés selon le test t de Student et le seuil de signification est fixé à 0,05 ($p < 0,05$).

Dans l'étude de la lipolyse stimulée, les résultats représentent l'effet net, c'est-à-dire la quantité de glycérol formé dans les échantillons où la lipolyse était stimulée, en présence ou non d'ouabaine, moins la quantité de glycérol formé dans les contrôles (lipolyse spontanée), avec ou sans ouabaine. Les courbes dose-réponse sont représentées graphiquement selon Lineweaver-Burk (1934): l'inverse de la concentration de l'agoniste est porté en abscisse et l'inverse de la concentration de glycérol ($\frac{1}{V}$), en ordonnée. Les lignes de régression furent calculées (Tables scientifiques, Geigy, 1962). Pour mieux comparer l'effet inhibiteur de l'ouabaine, les résultats dans ces graphiques sont exprimés en % de l'effet maximum de la drogue activant la lipolyse.

4. Produits utilisés.

L'OUABAINE (USP) et le N⁶-2'-O-Dibutyryl cyclique 3',5'-AMP cyclique, sous forme de sel de potassium, proviennent du Laboratoire Ca-Bio-Chem.

Le N⁶-2'-O-Dibutyryl 3',5'-AMP cyclique, sous forme de sel de Barium provient du Laboratoire de Dr. Posternak (Genève); ce sel doit être transformé en sel de sodium avant l'emploi.

L'ADRENALINE, sous forme de chlorhydrate, en solution à 1:1000, provient du Laboratoire Parke-Davis et Cie.

La NORADRENALINE, sous forme de bitartrate (=Levophed), en solution à 0,2% et l'ISOPROTERENOL, sous forme de chlorhydrate en solution à 0,2% (Isuprel), proviennent du Laboratoire Whintrop.

La THEOPHYLLINE et l'ALBUMINE BOVINE, fraction v, proviennent d'Armour Pharmaceutical Company.

Toutes les ENZYMES ET COENZYMES proviennent des Laboratoires C.F. Boehringer et Fils, S.à r.l.

RESULTATS

1. Action de l'ouabaine sur la lipolyse.

A. Action de l'ouabaine sur la lipolyse spontanée.

L'ouabaine aux concentrations utilisées ($5 \times 10^{-5}M$ et $10^{-4}M$) inhibe la lipolyse spontanée d'environ 20%.

B. Action de l'ouabaine sur la lipolyse stimulée par les catécholamines.

Le tableau 1 montre l'effet inhibiteur de l'ouabaine à différentes concentrations ($5 \times 10^{-5}M$ et $10^{-4}M$) sur la lipolyse stimulée par l'adrénaline. Cet effet inhibiteur augmente avec la concentration en ouabaine: à une concentration d'adrénaline de $10^{-5}M$, l'ouabaine $5 \times 10^{-5}M$ et $10^{-4}M$ diminue la lipolyse de 19% et 32%.

Avec des doses croissantes de catécholamines, l'effet inhibiteur de l'ouabaine décroît régulièrement aux deux concentrations étudiées; mais ce n'est qu'avec la plus faible dose ($5 \times 10^{-5}M$) que l'effet de l'ouabaine devient nul: la quantité de glycérol libéré est la même avec ou sans ouabaine dans le milieu d'incubation.

Tableau 1.

Action de l'Ouabaine sur la lipolyse stimulée par
l'Adrénaline

Drogue	Concentration	N	Glycérol $\mu\text{M/g}$ tissu		Glycérol $\mu\text{M/g}$ tissu		% de variation
Adrénaline					+OUABAINÉ $5 \times 10^{-5}\text{M}$		
	$1 \times 10^{-6}\text{M}$	4	1,23	$\pm 0,14$	0,66	$\pm 0,11$	-46,3
	$3,16 \times 10^{-6}\text{M}$	4	2,96	$\pm 0,45$	2,20	$\pm 0,26$	-25,7
	$1 \times 10^{-5}\text{M}$	4	4,70	$\pm 0,26$	3,80	$\pm 0,56$	-19,1
	$3,16 \times 10^{-5}\text{M}$	4	6,35	$\pm 1,22$	4,98	$\pm 0,66$	-21,6
	$1 \times 10^{-4}\text{M}$	4	6,37	$\pm 0,48$	6,48	$\pm 0,30$	+ 1,8
Adrénaline					+OUABAINÉ $1 \times 10^{-4}\text{M}$		
	$1 \times 10^{-5}\text{M}$	6	5,01	$\pm 0,47$	3,39	$\pm 0,69$	-32,3
	$3,16 \times 10^{-5}\text{M}$	6	5,87	$\pm 0,55$	4,40	$\pm 0,52$	-25,1
	$1 \times 10^{-4}\text{M}$	6	6,11	$\pm 0,64$	5,21	$\pm 0,44$	-14,7

Les figures I A et B montrent les courbes dose-réponse, représentées selon Lineweaver-Burk, de l'adrénaline seule ou en présence d'ouabaine $5 \times 10^{-5}\text{M}$ et 10^{-4}M . Dans le premier cas, les deux lignes de régression coupent l'ordonnée à l'origine ($= \frac{1}{V_{\text{max}}}$) au même endroit (0,94 et 0,99),

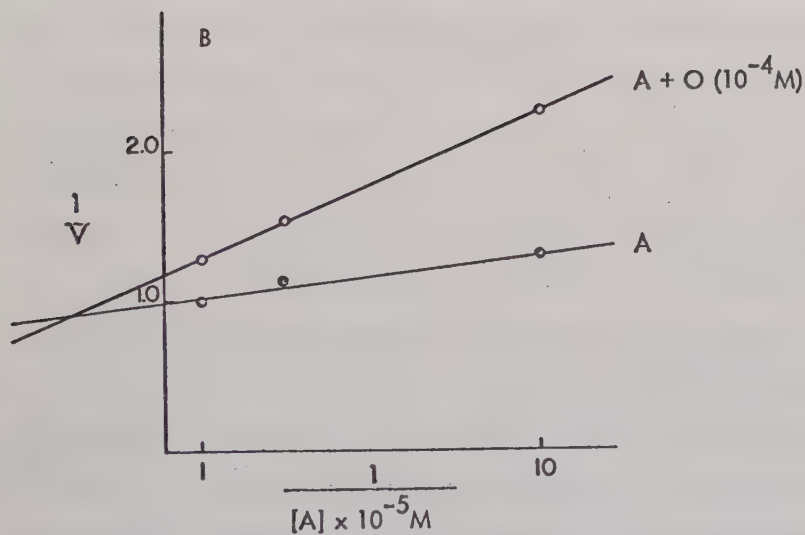
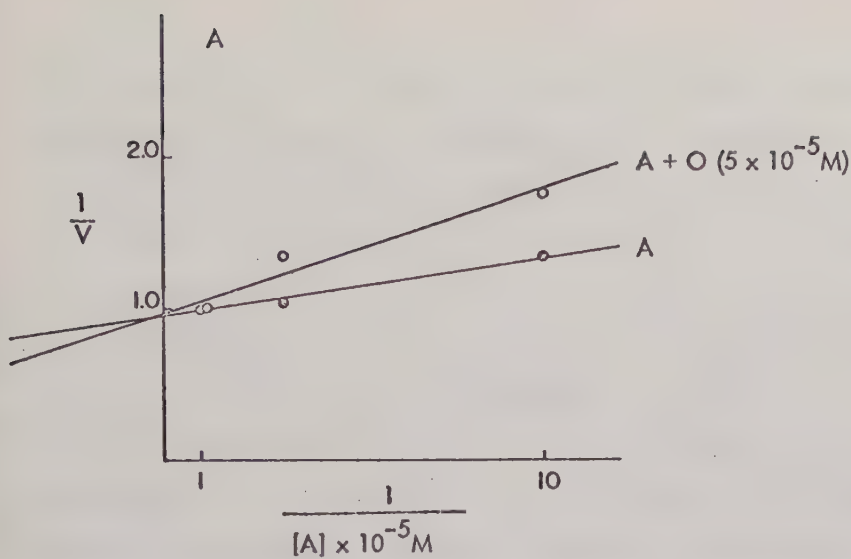


Figure 1: Interaction de l'Adrénaline (A) et de l'Ouabaine (O)

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{\% A \text{ Max}^{-1}} \times 100$$

A : Ouabaine $5 \times 10^{-5} M$

B : Ouabaine $10^{-4} M$

indiquant ainsi le caractère compétitif de l'interaction de l'ouabaine et de l'adrénaline. Cependant, en présence de plus fortes concentrations d'ouabaine (ici $10^{-4}M$), les deux lignes de régression ne coupent plus l'ordonnée au même endroit (0,99 et 1,2); dans ce cas, l'interaction de ces deux drogues n'est plus purement compétitive.

Des résultats semblables sont obtenus en présence d'isoprotérénol ou de noradrénaline et d'ouabaine. L'ouabaine $10^{-4}M$ diminue l'action lipolytique de l'isoprotérénol $10^{-6}M$ de 38% ($p < 0,01$); l'inhibition devient plus faible avec des doses croissantes d'isoprotérénol (Tableau 2); mais l'interaction de ces deux drogues n'est pas compétitive (Figure 2A). L'inhibition n'est que de 12% en présence d'isoprotérénol $10^{-5}M$; ceci est dû partiellement à l'autoinhibition observée à cette concentration; ce phénomène d'autoinhibition apparaît avec des doses supra-maxima de catécholamines: il pourrait s'agir d'un mécanisme de "feed-back" (Weiss 1966, Wenke 1964).

L'ouabaine $10^{-4}M$ diminue fortement l'action lipolytique de la noradrénaline en faibles concentrations ($10^{-6}M$), tandis qu'à une concentration de $3,16 \times 10^{-6}M$, l'inhibition n'est plus que de 21%. En présence d'ouabaine $5 \times 10^{-5}M$, la noradrénaline $10^{-5}M$ produit un effet maximum (Tableau 2); l'abaque (Figure 2B) montre également le caractère compétitif des deux drogues.

Tableau 2: Action de l'Ouabaine sur la lipolyse stimulée par l'Isoproténéról et la Noradrénaline.

Droque	Concentra- tion	N	Glycérol $\mu\text{M/g}$ tissu	Glycérol $\mu\text{M/g}$ tissu	% de variation
Isoprotérénol				+OUABAINÉ $1 \times 10^{-4}\text{M}$	
	$1 \times 10^{-6}\text{M}$	6	$8,30 \pm 0,85$	$5,14 \pm 0,52$	-38,6
	$3,16 \times 10^{-6}\text{M}$	6	$10,36 \pm 0,89$	$7,36 \pm 1,08$	-28,8
	$1 \times 10^{-5}\text{M}$	6	$9,00 \pm 0,62$	$7,90 \pm 0,57$	-12,2
Noradrénaline				+OUABAINÉ $1 \times 10^{-4}\text{M}$	
	$1 \times 10^{-6}\text{M}$	12	$1,89 \pm 0,44$	$0,55 \pm 0,17$	-71,2
	$3,16 \times 10^{-6}\text{M}$	12	$4,36 \pm 0,68$	$3,41 \pm 0,40$	-21,8
	$1 \times 10^{-5}\text{M}$	11	$5,32 \pm 0,67$	$4,72 \pm 0,46$	-21,3
Noradrénaline				+OUABAINÉ $5 \times 10^{-5}\text{M}$	
	$1 \times 10^{-6}\text{M}$	5	$5,47^* \pm 0,46$	$4,39^* \pm 0,63$	-19,8
	$3,16 \times 10^{-6}\text{M}$	5	$7,49^* \pm 0,35$	$6,82^* \pm 0,55$	- 9,0
	$1 \times 10^{-5}\text{M}$	5	$8,86^* \pm 0,33$	$8,49^* \pm 0,49$	- 4,2

*Valeur absolue (détermination enzymatique)

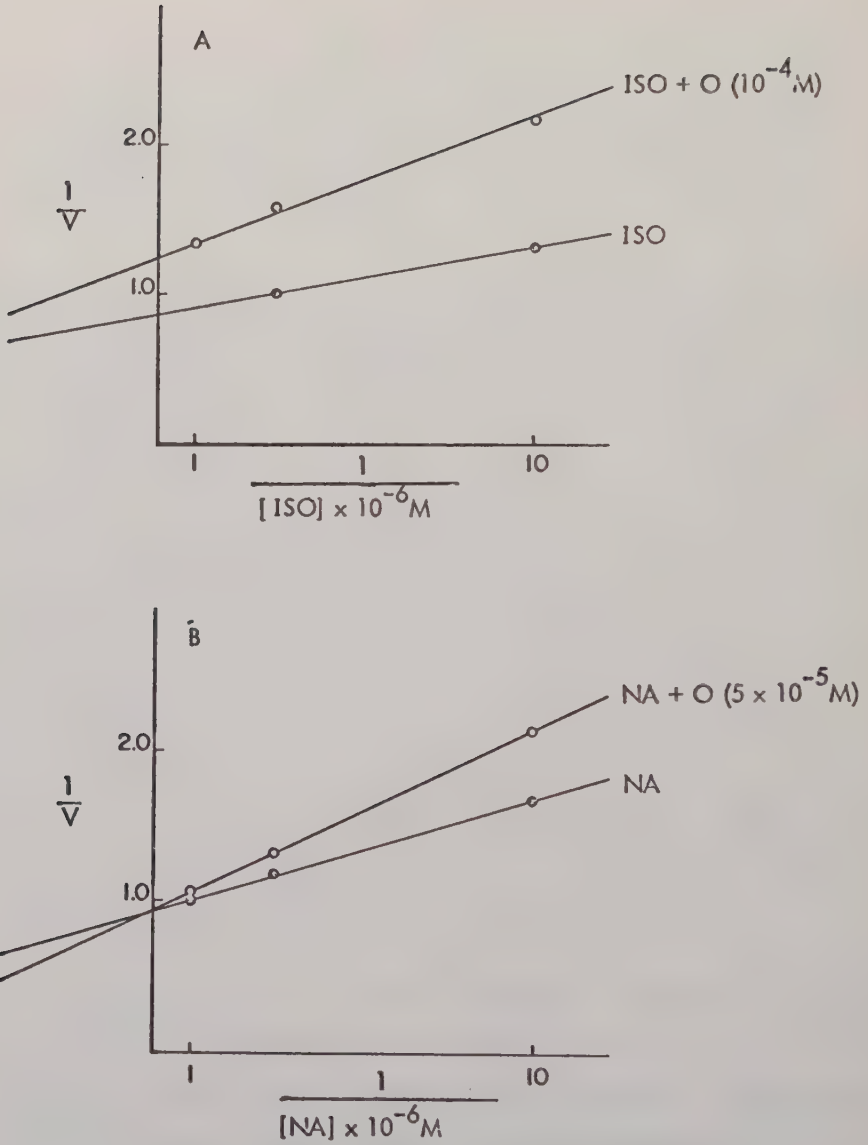


Figure 2: A. Interaction de l'Ouabaine ($10^{-4}M$) (O) et de l'Isoproterenol (Iso)
 B. Interaction de l'Ouabaine ($5 \times 10^{-5}M$) (O) et de la Noradrénaline (NA)

C. Action de l'ouabaine sur la lipolyse stimulée par le dibutyryl-3',5'-AMP cyclique et la theophylline.

L'ouabaine $5 \times 10^{-5}M$ n'a pas d'effet inhibiteur sur la lipolyse stimulée par le dibutyryl-AMP cyclique (DBA); au contraire on observe une stimulation, pas significative, mais régulière, de la lipolyse. Il y a une inhibition de 10% avec l'ouabaine $10^{-4}M$ et de 27% avec $10^{-3}M$ d'ouabaine. En présence d'ouabaine $10^{-3}M$ ou $10^{-4}M$ la lipolyse stimulée par la théophylline $10^{-2}M$ décroît de 26 et 17% respectivement (Tableau 3).

2. Action de l'ouabaine sur la glycogénolyse et la glycolyse dans le diaphragme.

En présence d'ouabaine $10^{-4}M$, le transport de glucose augmente de 33%, la concentration en glycogène de 53%; la formation d'acide lactique diminue de 25%, tandis que celle d'acide pyruvique augmente de 21% (Tableau 4).

La respiration du muscle n'est pas modifiée par l'ouabaine: la consommation totale d'oxygène étant de $702 \pm 30 \mu l O_2/g \text{ tissu /heure}$ et 727 ± 28 dans le contrôle.

L'ouabaine $10^{-4}M$ ne modifie pas significativement la teneur du muscle en G-1-P (-17%), tandis que le G-6-P augmente de 39% et le F-6-P de 34%, le F-1-6-P diminue significativement (-18%) (Tableau 5).

Tableau 3: Action de l'Ouabaine sur la lipolyse stimulée par le Dibutyryl-3',5'-AMP cyclique et la Théophylline.

Droque	Concentration	N	Glycérol $\mu\text{M/g}$ tissu	Glycérol $\mu\text{M/g}$ tissu	% de variati
Dibutyryl cyclique 3',5'-AMP	$1 \times 10^{-3}\text{M}$	6	5,67 $\pm 0,49$	+OUABAINÉ $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 6,47 $\pm 0,58$	+14,1
	$1,78 \times 10^{-3}\text{M}$	6	10,79 $\pm 0,89$	11,22 $\pm 0,69$	+ 4,0
	$3,16 \times 10^{-3}\text{M}$	5	11,35 $\pm 0,69$	11,31 $\pm 1,01$	- 0,3
Dibutyryl cyclique 3',5'-AMP	$1 \times 10^{-3}\text{M}$	10	4,77 $\pm 0,34$	+OUABAINÉ $1 \times 10^{-4}\text{M}$ 4,26 $\pm 0,41$	-10,7
	$1,78 \times 10^{-3}\text{M}$	10	7,85 $\pm 0,58$	7,13 $\pm 0,56$	- 9,2
	$3,16 \times 10^{-3}\text{M}$	10	9,18 $\pm 0,62$	8,00 $\pm 0,50$	-12,9
Dibutyryl cyclique 3',5'-AMP	$3,16 \times 10^{-3}\text{M}$	5	7,57 $\pm 0,79$	+OUABAINÉ $1 \times 10^{-3}\text{M}$ 5,53 $\pm 0,28$	-27,0
Théophylline	$1 \times 10^{-3}\text{M}$	8	4,67 $\pm 0,47$	+OUABAINÉ $1 \times 10^{-4}\text{M}$ 5,19 $\pm 0,62$	+11,1
	$3,16 \times 10^{-3}\text{M}$	8	8,14 $\pm 0,59$	6,66 $\pm 0,58$	-18,2
	$1 \times 10^{-2}\text{M}$	8	6,09 $\pm 0,54$	5,05 $\pm 0,50$	-17,1
Théophylline	$1 \times 10^{-2}\text{M}$	5	8,54 $\pm 1,14$	+OUABAINÉ $1 \times 10^{-3}\text{M}$ 6,28 $\pm 1,16$	-26,5

Tableau 4: Action de l'Ouabaine ($10^{-4}M$) sur la prise de glucose, la teneur en glycogène du diaphragme et la formation d'acide lactique et pyruvique.

	N	Contrôle $\mu M/1\text{ g tissu}$	N	Ouabaine $10^{-4}M$ $\mu M/1\text{ g tissu}$	% de variation
Glycogène	11	$7,15 \pm 0,56$	11	$10,93^* \pm 0,63$	+53
Prise du glucose	14	$15,36 \pm 1,39$	14	$20,44^* \pm 1,66$	+33
Acide lactique	16	$31,58 \pm 1,26$	15	$23,96^* \pm 1,00$	-25
Acide pyruvique	15	$1,41 \pm 0,00$	15	$1,71^* \pm 0,00$	+21

* $p < 0,05$

Tableau 5: Action de l'Ouabaine sur la teneur en glucose-1-phosphate, glucose-5-phosphate, fructose-6-phosphate et fructose-1-6-phosphate du diaphragme.

	N	Contrôle $\mu M/100\text{ g tissu}$	N	Ouabaine $10^{-4}M$ $\mu M/100\text{ g tissu}$	% de variation
G-1-P	14	$4,03 \pm 0,75$	13	$4,73 \pm 1,14$	+17%
G-6-P	17	$16,10 \pm 0,86$	18	$22,37^* \pm 1,07$	+39%
F-6-P	13	$4,34 \pm 0,38$	13	$5,80^* \pm 0,50$	+34%
F-1-6-P	13	$7,56 \pm 0,49$	13	$6,20^* \pm 0,42$	-18%

* $p < 0,05$

Interaction de l'ouabaine et des catécholamines.

Certains auteurs ont observé que l'ouabaine modifie la prise des catécholamines par certains tissus (Dengler 1962, Bogdanski 1968). Afin de s'assurer que les changements métaboliques observés en présence d'ouabaine n'étaient pas dûs à une modification du taux intracellulaire de catécholamines, nous avons fait deux séries d'expériences. Dans l'une nous avons mesuré la prise de ^3H -noradrénaline par le diaphragme: la teneur du muscle en ^3H -noradrénaline est la même en présence ou en absence d'ouabaine. L'autre série d'expériences était destinée à savoir si l'ouabaine modifie l'activité des enzymes dégradant les catécholamines. A cet effet du tissu adipeux fut incubé dans un milieu contenant de la ^3H -noradrénaline 10^{-5}M , avec et sans ouabaine 10^{-4}M . A la fin de l'incubation, les catécholamines et les produits de dégradation du milieu furent séparés par chromatographie descendante sur papier et la radioactivité mesurée directement sur un détecteur: la radioactivité est la même en présence ou en absence d'ouabaine. Les changements observés in vitro sont bien dûs à l'action intrinsèque de l'ouabaine.

DISCUSSION

L'AMP cyclique produit de l'hydrolyse enzymatique de l'ATP par l'adenyl cyclase, est le médiateur de l'action des catécholamines sur la lipolyse. Nous savons aussi qu'aux doses utilisées, l'ouabaine est un inhibiteur de la Na^+ , K^+ -ATPase. Les effets lipolytiques des catécholamines sont inhibés par l'ouabaine. Cette inhibition de la lipolyse stimulée par les catécholamines pourrait être liée à l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase par le mécanisme suivant:

L'hydrolyse de l'ATP par cette enzyme se ferait en deux étapes:

- 1) Formation d'un complexe enzyme-phosphate (E-P) et libération d'ADP.
- 2) Hydrolyse du complexe (E-P), régénération de l'enzyme et libération de phosphate inorganique (P_i). L'ouabaine, en stabilisant le complexe phosphorylé, retarderait l'hydrolyse de l'ATP. L'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase limiterait l'utilisation et la disponibilité d'ATP, substrat de l'adenyl cyclase et cofacteur de l'activation de la lipase (Schéma 2).

Or dans les expériences décrites ci-dessus, l'interaction de l'ouabaine à faible concentration ($5 \times 10^{-5}\text{M}$) et des catécholamines est purement compétitive: l'action inhibitrice de l'ouabaine peut être compensée avec des doses croissantes de catécholamines; les courbes dose-réponse, représentées

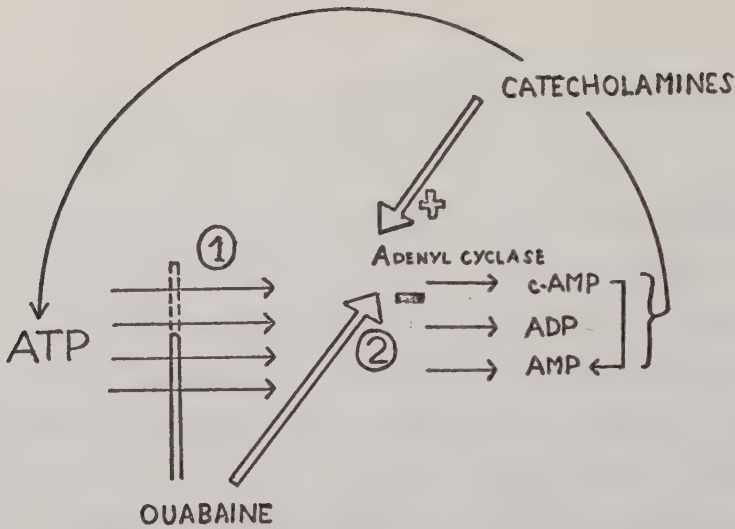


Schéma 2. Représentation du mécanisme possible de l'interaction de l'ouabaine et des catécholamines

- 1) Na^+ , K^+ -ATPase
- 2) adényl cyclase

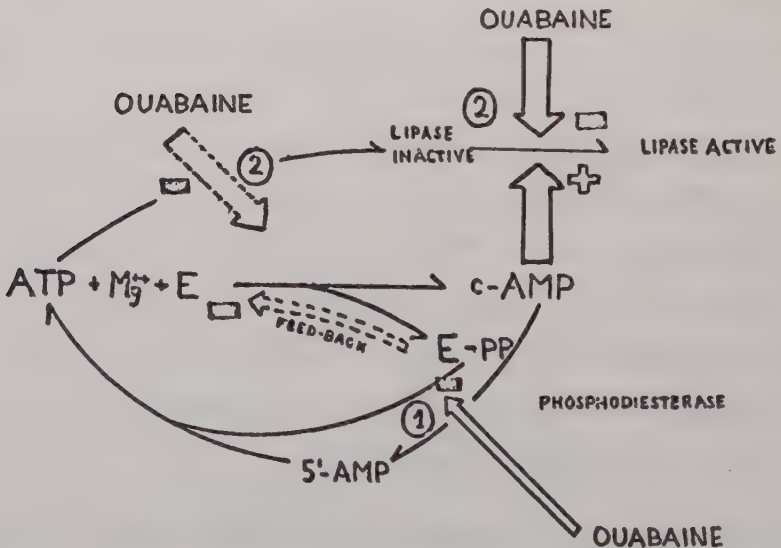


Schéma 3. Représentation de l'hypothèse proposée pour expliquer l'inhibition par l'ouabaine de la lipolyse stimulée par les catécholamines.

- 1) action sur l'adényl cyclase
- 2) action sur la lipase

selon Lineweaver-Burk ($1/\text{effet} / 1/\text{dose}$), de l'adrénaline et de l'adrénaline + ouabaine ont la même ordonnée à l'origine, indiquant un effet maximum égal dans les deux cas. Il n'est donc pas possible d'expliquer l'action inhibitrice de l'ouabaine sur la lipolyse uniquement par son action sur la Na^+ , K^+ -ATPase par le mécanisme exposé ci-dessus, c'est-à-dire diminution de la disponibilité d'ATP. Par conséquent l'ouabaine ne peut exercer son action que sur le système enzymatique activé par les catécholamines: l'adényl cyclase. Ces conclusions sont en accord avec Ho (1967 b), qui a observé une diminution du taux d'AMP cyclique dans le tissu adipeux en présence d'ouabaine, et avec Fassina (1967), qui démontra, dans le tissu adipeux, que la digitoxine à faible concentration (10^{-5} - 10^{-4} M) est un antagoniste compétitif de la noradrénaline.

L'ouabaine agit dans ce cas de la même manière qu'un β -bloqueur. L'effet biphasique de l'ouabaine observé par certains auteurs (Repke 1965, Palmer 1964, McLane 1964) appuie cette comparaison: les β -bloqueurs ont une action stimulante à faible dose, tandis qu'à plus forte dose, ce sont des inhibiteurs compétitifs spécifiques, et à forte dose, des inhibiteurs non compétitifs, non spécifiques (Wenke 1966, Brodie 1966).

La similarité entre la Na^+ , K^+ -ATPase et l'adényl cyclase (même substrat, inhibition par l'ouabaine, compensée

par K^+) permet de proposer l'hypothèse que l'ouabaine inhiberait l'adényl cyclase par un mécanisme semblable à celui proposé pour expliquer l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase par l'ouabaine, c'est-à-dire: l'accumulation de l'intermédiaire phosphorylé (Schéma 3).

A plus forte concentration ($10^{-4}M$), l'interaction de l'ouabaine et des catécholamines n'est plus compétitive: les courbes dose-réponse, représentées selon Lineweaver-Burk, ne coupent plus l'ordonnée à l'origine. Cette observation pourrait indiquer que l'ouabaine, à cette concentration ($10^{-4}M$), a un second point d'action, au-delà de l'adényl cyclase, que nous pourrions situer au niveau de l'activation de la lipase.

Afin de localiser ce second point d'action de l'ouabaine, nous avons utilisé le dibutryl-AMP cyclique (DBA) et la théophylline afin d'activer la lipase directement. L'ouabaine à une concentration de $5 \times 10^{-5}M$ n'inhibe pas la lipolyse stimulée par le DBA, tandis qu'à plus forte concentration ($10^{-4} - 10^{-3}M$), l'ouabaine diminue l'action lipolytique du DBA et de la théophylline; ces résultats indiquent une action directe de l'ouabaine sur la lipase des triglycérides.

L'inhibition de la lipase pourrait être secondaire à l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase par l'ouabaine. Nous avons vu que l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase par l'ouabaine

pourrait diminuer l'utilisation ou la disponibilité de l'ATP; or l'ATP est un cofacteur nécessaire à la conversion de la forme inactive de la lipase en sa forme active (Rizack 1964). Fassina (1967 a) a proposé un mécanisme semblable pour expliquer l'action inhibitrice de certains inhibiteurs de la phosphorylation oxydative sur la lipolyse stimulée par le dibutryl-AMP cyclique.

Le mécanisme d'activation de la lipase est encore inconnu; se référant au mécanisme bien étudié de l'activation de la phosphorylase, il serait tentant de postuler que l'activation de la lipase est une phosphorylation de la forme inactive, catalysée par une ATPase spécifique; l'ouabaine pourrait inhiber directement cette enzyme par le même mécanisme que celui proposé pour l'ATPase membranaire.

Les mêmes observations peuvent être faites dans le diaphragme, les enzymes-clefs de la glycolyse et glycogénolyse étant sensibles aux mêmes changements que la lipase; leur mécanisme est mieux connu et a été étudié en détails.

En présence d'ouabaine 10^{-4} M, le taux de glycogène du diaphragme augmente par rapport au contrôle, simultanément la prise de glucose augmente et la formation d'acide lactique diminue. Les résultats sont en accord avec ceux de Clausen (1965), Ho (1967 a) et les études

précédentes de ce laboratoire (Kypson 1968 a, b) suggérant que l'ouabaine augmente la glycogénèse et inhibe la glyco-génolyse, et qu'elle exerce son action probablement au niveau de la synthétase du glycogène et de la phosphorylase. Le taux de G-1-P du muscle ne change pas en présence d'ouabaine, malgré le taux élevé de G-6-P; le G-1-P étant le substrat de la synthétase du glycogène (Larner 1966), l'activité de cette enzyme a donc augmenté.

Alors que le G-6-P et le F-6-P augmentent dans le muscle en présence d'ouabaine, le F-1-6-P diminue, indiquant également une inhibition de la phosphofructokinase.

Comme décrit dans l'introduction, ces 3 enzymes, la phosphorylase, la synthétase du glycogène et la phosphofructokinase, existent sous deux formes; l'une est sous le contrôle de certains métabolites intermédiaires, l'autre, de certaines hormones. Dans le premier cas, l'inhibition de ces enzymes par l'ouabaine pourrait être liée à son action sur la Na^+ , K^+ -ATPase. Se référant au mécanisme d'action de l'ouabaine décrit précédemment, l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase produirait une diminution du P_i libre et de l'ATP disponible; le P_i est un activateur de ces enzymes, alors qu'en présence d'AMP cyclique, l'ATP est nécessaire à la conversion de la phosphorylase b en a, de la synthétase I en D, de la phosphofructokinase inactive dans sa forme active. Si la disponibilité de P_i et

d'ATP est réduite, il en résulte une modification de l'activité totale de ces enzymes.

Le passage d'une forme à l'autre de la phosphorylase ou de la synthétase du glycogène est un transfert de phosphate de l'ATP à l'enzyme. Les systèmes enzymatiques catalysant cette phosphorylation peuvent être considérés comme des "ATPase" spécifiques. L'ouabaine pourrait agir directement sur ces enzymes par le même mécanisme que celui proposé précédemment.

La phosphofructokinase est également une ATPase, catalysant la formation de F-1-6-P à partir d'ATP et de F-6-P.

Les catécholamines modifient également l'activité de la phosphorylase, de la synthétase du glycogène et de la phosphofructokinase. Le mécanisme par lequel les catécholamines modifient l'activité de ces enzymes est le même que pour la lipase: augmentation de la formation d'AMP cyclique. Kypson (1968 a, b) a montré dans le diaphragme que l'ouabaine et la digitoxine antagonisent aussi l'effet des catécholamines sur le métabolisme glucidique. L'antagonisme de l'ouabaine et des catécholamines observé dans le tissu adipeux pourrait contribuer à l'explication de l'action de l'ouabaine sur les enzymes glycolytiques.

En résumé, l'ouabaine agirait sur le système lipolytique de deux manières différentes: elle agirait et sur

la lipase, directement ou indirectement par diminution de la disponibilité d'ATP et sur l'adenyl cyclase. La formation d'ATP cyclique étant l'étape limitante de la lipolyse, c'est probablement l'action sur l'adényl cyclase qui contrôlerait l'inhibition de la lipolyse par ce composé.

L'ouabaine modifie probablement le métabolisme glucidique de façon semblable: inhibition de l'adényl cyclase, et diminution de la disponibilité d'ATP et de P_i réglant l'activité de la phosphorylase, de la synthétase du glycogène et de la phosphofructokinase ou inhibition directe de ces enzymes.

ETUDE IN VIVO

A la suite des travaux décrivant l'action anti-glycolytique et -lipolytique de l'ouabaine in vitro, les expériences in vitro décrites dans le chapitre précédent eurent pour but d'élucider le mécanisme d'action de l'ouabaine sur la lipolyse, la glycolyse et la glycogénolyse. Simultanément, les effets métaboliques de l'ouabaine in vivo furent étudiés dans ce laboratoire sur des chiens. Cette étude in vivo était particulièrement importante, étant donnée la différence entre les doses utilisées in vitro et in vivo. En effet in vivo la dose d'ouabaine ($1 \mu\text{g/kg/min.}$ pendant 60 min.) était plus faible que dans les expériences in vitro; cette dose était 3-4 fois supérieure à la dose thérapeutique. Dans ces expériences, l'ouabaine diminuait significativement le taux plasmatique du glucose, du glycérol et des acides gras libres; l'ouabaine inhibait également l'effet lipolytique et glycolytique de l'adrénaline (Triner 1968 a).

L'administration simultanée d'ouabaine et d'un β -bloqueur (propranolol) prolongeait et accentuait la baisse plasmatique du glucose provoquée par l'ouabaine seule (Triner 1968 b). Plusieurs travaux in vitro (Bihler 1968, Ho 1967, Clausen 1966) ont comparé les effets métaboliques de l'ouabaine à ceux de l'insuline. In vivo l'hypoglycémie est aussi plus prononcée et de plus longue durée lorsque de l'insuline et de l'ouabaine furent administrées simultanément.

Ces expériences indiquent que les effets métaboliques de l'ouabaine observés in vivo pourraient être dûs: 1) à son action directe, décrite dans le chapitre précédent: augmentation de la prise du glucose, inhibition de certaines enzymes lipolytiques et glycolytiques, action antiadrénergique; 2) à une action indirecte: médiation par l'insuline, soit en facilitant l'action de l'insuline, soit en élevant le taux d'insuline; 3) à son action directe et indirecte simultanément.

Dans les expériences décrites ci-dessous, nous avons cherché à définir la relation entre ouabaine et insuline, et le mécanisme responsable de l'effet hypoglycémique et antilipolytique de l'ouabaine in vivo. A cet effet, deux groupes de chiens furent comparés, les uns normaux ayant un pancréas intact, les autres pancréatectomisés.

METHODES

Protocole expérimental.

Cette étude a été effectuée sur des chiens maintenus en état de jeûne pendant 18 heures avant l'expérience. Les animaux furent anesthésiés au pentobarbital de sodium (35 mg/kg) administré par voie intraveineuse, et intubés avec une sonde endotrachéale à ballonnet gonflable, rendant le circuit respiratoire hermétique. Tout au long de l'expérience, les animaux furent ventilés mécaniquement avec de l'oxygène pur saturé d'eau à un rythme et volume constants, afin de maintenir l'équilibre acido-basique et la saturation du sang en oxygène normaux. Les animaux furent ventilés pendant au moins 30 minutes après l'anesthésie, avant les premières mesures de contrôle.

La relaxation musculaire est obtenue avec une dose initiale (4 mg) de chlorhydrate de succinylcholine, administrée par voie intraveineuse, suivie, pendant toute la durée de l'expérience, d'une perfusion continue de 250 µg/min. La température centrale de l'animal est maintenue à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Des cathéters en polyéthylène sont introduits dans une artère et une veine fémorale et dans une veine jugulaire. Un autre cathéter en polyéthylène est introduit par fluoroscopie dans la veine hépatique en passant par la veine jugulaire droite; chez les chiens normaux, après laparotomie, un autre cathéter est introduit dans la veine porte par

l'une des branches de la veine gastro-splénique.

Une autre paire de cathéters est placée dans l'artère fémorale gauche et dans la veine fémorale droite, par une veine collatérale, afin de permettre un débit normal dans la veine fémorale. Chez quelques animaux, l'artère fémorale droite est mise à découvert et utilisée pour mesurer le débit sanguin.

Une pancréatectomie totale fut faite sur 8 chiens, en prenant garde de ne pas endommager le réseau vasculaire alimentant le duodénum. Un examen minutieux fut fait pour s'assurer qu'il n'y avait plus aucun tissu pancréatique présent. Un cathéter en polyvinyl est introduit dans la veine porte, par une des branches de la veine gastrosplénique; l'orifice de ce cathéter est maintenu à la surface de la peau afin de permettre le prélèvement des échantillons de sang. Après l'opération, les animaux reçurent des antibiotiques et le jour suivant, une infusion lente et continue de soluté physiologique contenant du bicarbonate, pour remédier à la déshydratation et à l'acidose diabétique, suivant l'opération. Ils reçurent également de l'insuline normale i.m.; la dose est adaptée selon le taux sanguin de glucose. L'insuline fut supprimée 24 heures avant l'expérience, qui eut lieu 3 - 7 jours après l'opération. Berson et al. (1956) ont montré que l'insuline d'origine exogène a une période de 40 minutes. Davidson et al. (1967)

ont confirmé ces résultats et ont montré que l'activité de l'insuline du sérum est pratiquement nulle 48 heures après l'ablation du pancréas. Le taux plasmatique du glucose varia de 250 - 300 mg% chez les chiens pancréa-tectomisés au moment de l'expérience; tous réagirent aux injections d'insuline.

Perfusion d'ouabaine.

Après une période de contrôle de 30 minutes, l'ouabaine (1 μ g/0,1 ml de soluté physiologique/kg/min.) fut administrée dans la veine fémorale gauche pendant 60 minutes; les animaux furent observés pendant une heure après la fin de la perfusion d'ouabaine.

La pression artérielle et le pouls sont enregistrés à intervalles réguliers dans l'artère fémorale gauche.

Les échantillons de sang artériel périphérique sont prélevés dans la même artère. Pour mesurer les différences porto-hépatique et artério-veineuse, les échantillons sont prélevés dans les vaisseaux correspondants, au même moment et de la même façon.

Après chaque prélèvement de sang, un volume égal de dextran est injecté, ainsi que quelques ml de soluté physiologique pour rincer le cathéter. Seul le soluté physiologique, remplissant les cathéters avant leur utilisation, contient de l'héparine.

Mesures physiologiques.

La pression artérielle et le pouls sont enregistrés à l'aide de transmetteurs de pression de type Statham et d'un appareil enregistreur Grass à canaux multiples. La température centrale est mesurée à l'aide d'une sonde œsophagienne reliée à un thermo-couple. La $\dot{V}O_2$ est mesurée dans un spiromètre à circuit clos construit par A. St.J. Lee (1966), relié à un computer.

Le débit sanguin de l'artère fémorale est mesuré tout au long de l'expérience et enregistré par un computer électro-magnétique, Statham Multiflo M-4000 à l'aide d'une sonde annulaire Statham, modèle 9, s'ajustant exactement autour de l'artère fémorale.

Des échantillons de sang artériel de 6 ml sont prélevés anaérobiquement dans l'artère fémorale et recueillis dans des seringues contenant de l'héparine et gardées sur de la glace; le pH, la pCO₂ et le bicarbonate actuel sont mesurés immédiatement par la microméthode des triples pH d'Astrup, en utilisant l'équipement d'Astrup et le nomogramme de Siggaard-Anderson (1965). Le reste de l'échantillon et les échantillons de sang prélevés dans la veine fémorale, porte et hépatique sont centrifugés et le plasma préparé pour mesurer les électrolytes et/ou le glucose.

Il est très important de séparer le plasma des globules rouges aussi rapidement que possible, afin d'éviter principalement toute diffusion du sodium et du potassium.

Mesures biochimiques.

Toute mesure fut faite en double et les valeurs de contrôle sont la moyenne de deux mesures.

Electrolytes: Le sodium et le potassium plasmatique furent mesurés simultanément dans un photomètre à flamme, relié à un computer permettant une lecture directe de la concentration, en mEq/L; la flamme est standardisée avec du lithium. 0,05 ml. de plasma sont dilués dans 10 ml. d'une solution aqueuse contenant 1,5 mEq/L de lithium.

Mesure du glucose.

Le glucose est mesuré enzymatiquement avec le Glucostat (voir méthodes in vitro).

L'expression des résultats et leur évaluation statistique est la même que dans les expériences in vitro.

RESULTATS.

Effets cardio-vasculaires.

Chez les chiens intacts et pancréatectomisés, la pression artérielle moyenne tend à augmenter pendant la perfusion d'ouabaine, alors que le rythme cardiaque diminue significativement. L'électrocardiogramme ne montre pas de modifications importantes, et aucun signe de toxicité n'est remarqué. Pendant toute la durée de l'expérience, on n'observe pas de changements significatifs du débit sanguin dans l'artère fémorale, de la consommation d'oxygène et de l'équilibre acido-basique; les valeurs du pH, de la $p\text{CO}_2$ et du HCO_3^- sont normales (Tableaux 6 et 7).

Effets métaboliques.

Chez les chiens pancréatectomisés, le taux plasmatique de glucose de la période de contrôle est beaucoup plus élevé (270 mg%) que chez le chien normal (103 mg%) et tombe à 256 mg% pendant la perfusion d'ouabaine; cette diminution (-5%) est inférieure à celle observée chez les animaux intacts (-22%, $p < 0,05$) et n'est pas significative (Figure 3). Chez le chien normal, pendant la période de contrôle, le niveau plasmatique de glucose est plus élevé dans la veine hépatique que dans la veine porte (+6mg/100 ml) indiquant que le foie décharge une faible, mais constante, quantité de glucose. Pendant la perfusion d'ouabaine, au contraire, le foie prend du glucose; la différence porto-

Tableau 6: Altération de la pression artérielle moyenne, du rythme cardiaque, du débit sanguin dans l'artère fémorale, le pH artériel, la $p\text{CO}_2$, le bicarbonate et la consommation en O_2 ($\dot{\text{V}}\text{O}_2$) à la suite de la perfusion d'ouabaine ($1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ pendant 60 minutes) chez le chien normal ($N=8$).

	Contrôle	Perfusion d'Ouabaine			
	0-30	30-60	60-90	90-120	120-150 Min
Pression artérielle moyenne mm Hg	137 ± 6	143 ± 6	151 ± 8	144 ± 7	124 ± 4
Rythme cardiaque pouls/min.	173 ± 11	165 ± 10	139 ± 12	142 ± 15	146 ± 1
Débit sanguin ml/min	$22,8 \pm 5,3$	$24,8 \pm 7,5$	$21,0 \pm 4,5$	$18,0 \pm 2,2$	$21,0 \pm 1,5$
$\dot{\text{V}}\text{O}_2$ ml/kg/min	$7,07 \pm 0,44$	$7,21 \pm 0,46$	$6,97 \pm 0,44$	$6,98 \pm 0,52$	$6,87 \pm 0,44$
pHa	7,38	7,38	7,38	7,36	7,35
$p\text{CO}_2$ mm Hg	$25,8 \pm 1,3$	$25,7 \pm 1,8$	$24,7 \pm 2,2$	$25,2 \pm 3,3$	$28,9 \pm 1,5$
HCO_3^- mEq/l	$15,0 \pm 0,7$	$14,5 \pm 0,9$	$14,0 \pm 0,8$	$12,9 \pm 1,2$	$14,2 \pm 0,8$

Tableau 7: Altération de la pression artérielle moyenne, du rythme cardiaque, du débit sanguin dans l'artère fémorale, le pH artériel, la $p\text{CO}_2$, le bicarbonate et la consommation en O_2 ($\dot{\text{V}}\text{O}_2$) à la suite de la perfusion d'ouabaine (1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ pendant 60 minutes) chez les chiens pancréatectomisés (N=8).

	Contrôle	Perfusion d'Ouabaine			
	0-30	30-60	60-90	90-120	120-150 Min
Pression artérielle moyenne mm Hg	125 $\pm$ 10	127 $\pm$ 12	134 $\pm$ 14	127 $\pm$ 16	109 $\pm$ 9
Rythme cardiaque bats/min.	182 $\pm$ 8	183 $\pm$ 12	168 $\pm$ 16	133 $\pm$ 22	151 $\pm$ 19
Débit sanguin ml/min	17,6 $\pm$ 4,3	17,3 $\pm$ 5,4	16,5 $\pm$ 3,6	16,3 $\pm$ 4,9	16,3 $\pm$ 4,9
	7,26 $\pm$ 0,21	7,43 $\pm$ 0,21	7,17 $\pm$ 0,24	7,11 $\pm$ 0,35	7,20 $\pm$ 0,27
	7,38	7,37	7,36	7,34	7,34
pO_2 mm Hg	27,1 $\pm$ 2,1	27,3 $\pm$ 2,5	25,8 $\pm$ 2,7	26,3 $\pm$ 2,7	25,7 $\pm$ 2,5
pH mEq /l	15,8 $\pm$ 1,0	15,0 $\pm$ 1,1	13,9 $\pm$ 0,9	13,4 $\pm$ 0,9	13,1 $\pm$ 0,9

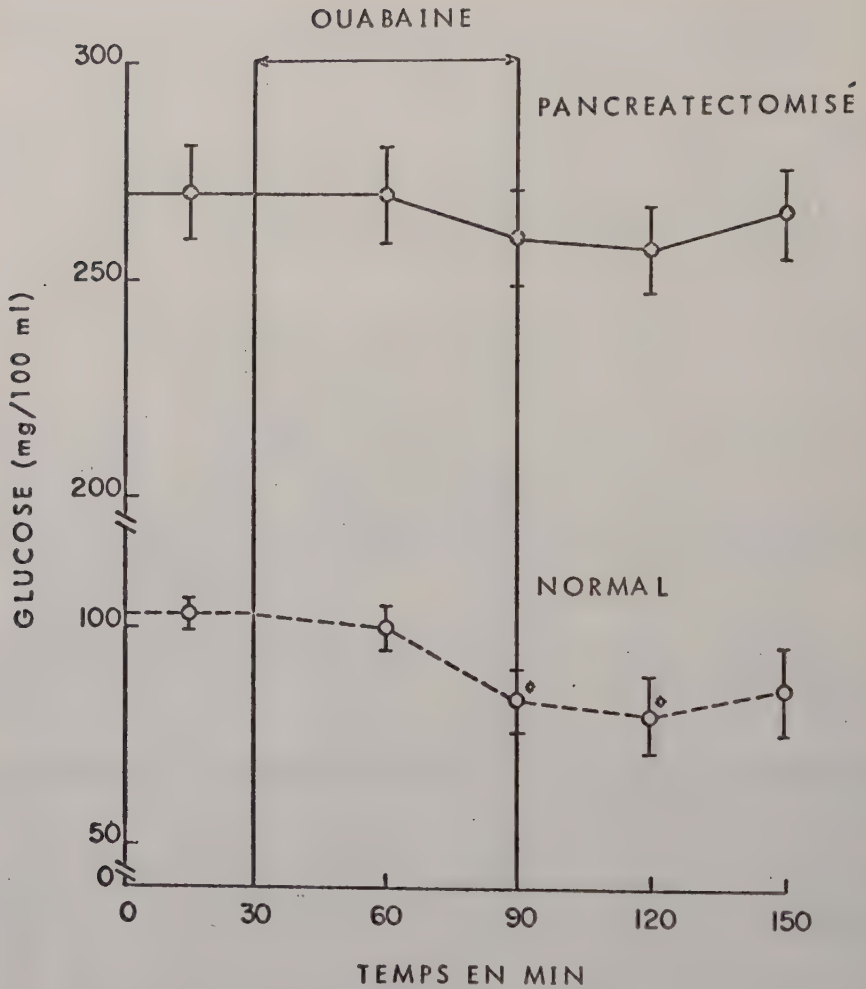


Figure 3: Modification du glucose plasmatique chez le chien normal (N=10) et pancréatectomisé (N=8) pendant la perfusion d'ouabaine (1 μ g/kg/min).

* $p < 0,05$

hépatique est de $-13,6 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ($p < 0,05$) (Figure 4). Les variations du potassium plasmatique parallèlent les changements du glucose : la différence porto-hépatique à la fin de la perfusion d'ouabaine est de $-0,4 \text{ mEq}/\text{l}$ ($p < 0,05$) chez le chien normal.

Chez le chien pancréatectomisé, la différence porto-hépatique du glucose est également positive ($+5,3 \text{ mg}/100 \text{ ml}$) pendant la période de contrôle, alors que pendant la perfusion d'ouabaine, on observe un net débit de glucose ($+30,2 \text{ mg}/100 \text{ ml}$). L'augmentation de la différence porto-hépatique du glucose plasmatique est accompagnée d'une même augmentation de la différence porto-hépatique du K^+ plasmatique ($+0,2 \text{ mEq}/\text{L}$, $p < 0,05$), indiquant que le foie libère aussi des ions potassium sous l'influence de l'ouabaine (Lown 1960) (Figure 4).

Le débit sanguin fut mesuré dans l'artère fémorale en même temps que le glucose plasmatique de l'artère et de la veine fémorale. La différence artério-veineuse et le débit sanguin permirent de calculer la prise de glucose par le muscle ($\mu\text{g}/\text{min}$) (Tableau 8); elle est exprimée pour chaque chien en % des valeurs de contrôle (Figure 5). Chez le chien normal, le glucose pris par le muscle augmente de 171% ($p < 0,05$) pendant la perfusion d'ouabaine et retourne aux valeurs de contrôle 60 minutes après la fin de la perfusion. Au contraire, chez le chien pancréatectomisé, la prise de glucose par le muscle ne change pas pendant la perfusion d'ouabaine.

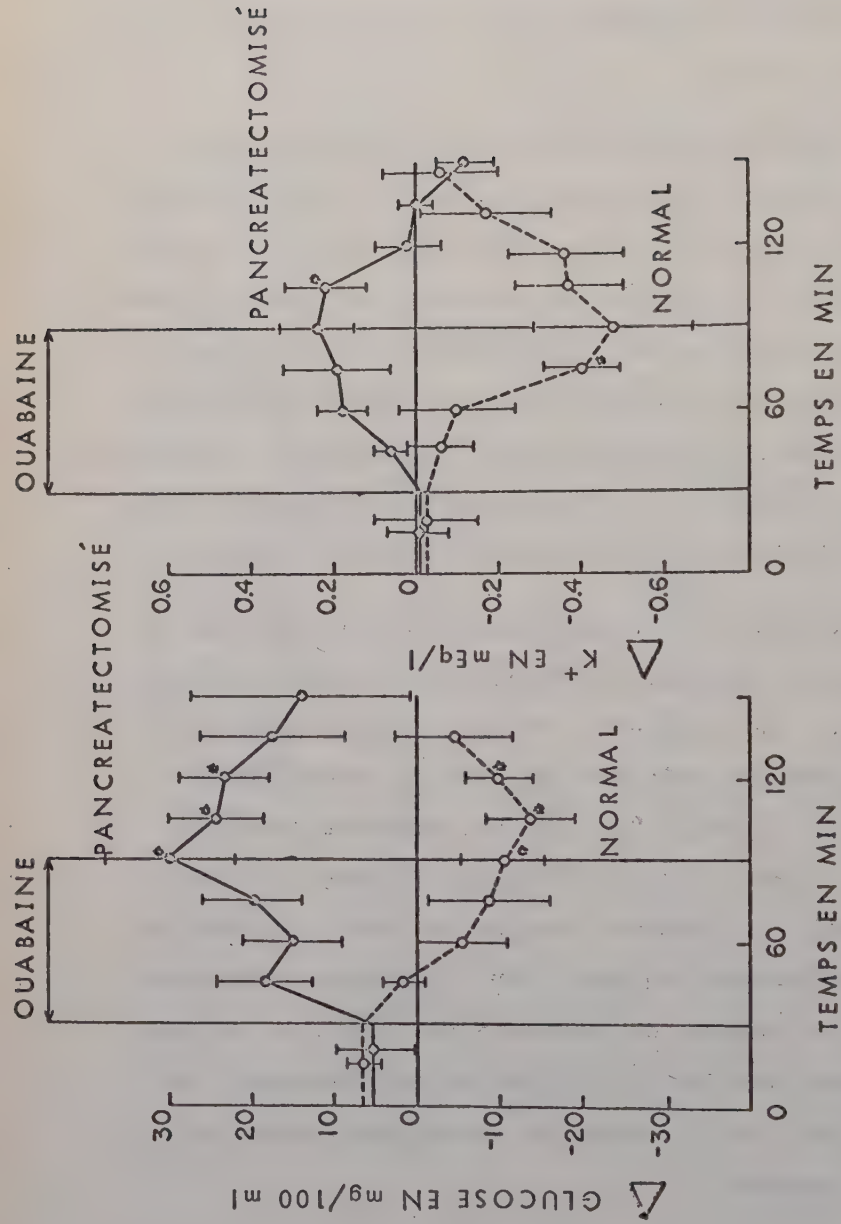


Figure 4: Modification de la différence (Δ) porto-hépatique de glucose et de K^+ chez le chien normal (N=4) et pancréatectomisé (N=5) pendant la perfusion d'ouabaine ($1 \mu\text{g/kg/min}$).

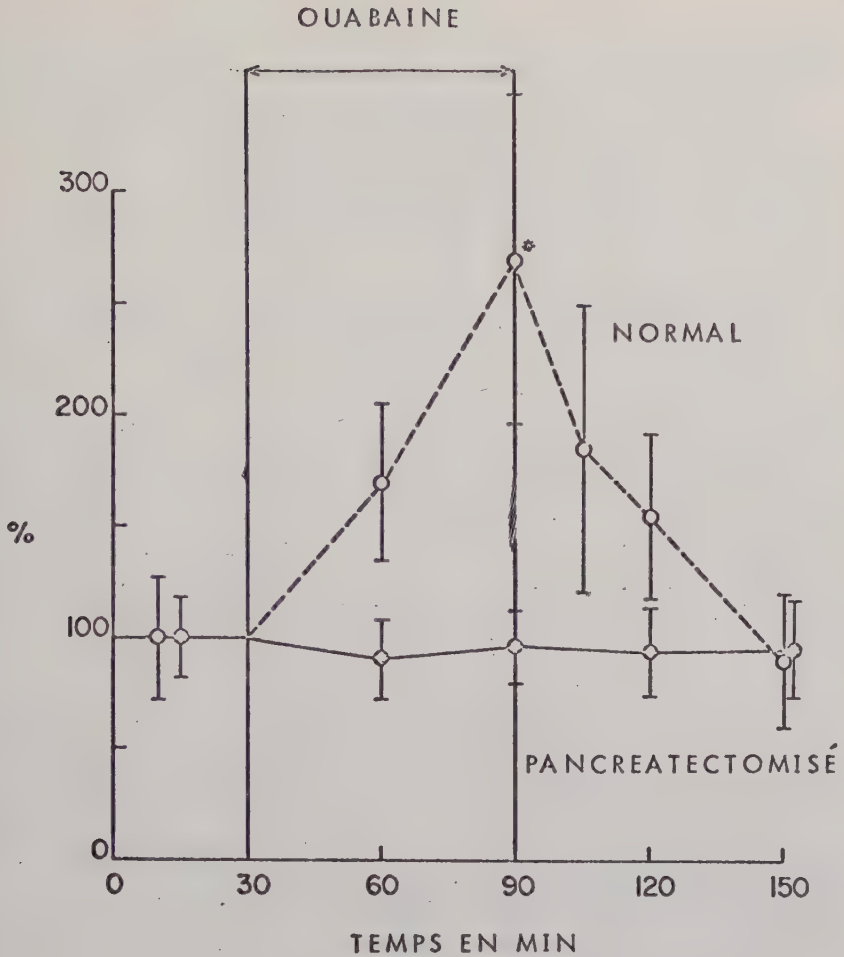


Figure 5: Modification de la prise du glucose ($\mu\text{g}/\text{min}$) par le muscle de la patte postérieure chez le chien normal ($N=5$) et pancréatectomisé ($N=6$) pendant la perfusion d'ouabaine ($1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$). Les résultats, calculés à partir du débit de l'artère fémorale et de la différence artério-veineuse du glucose plasmatique, sont exprimés en % du contrôle.

* $p < 0,05$

Tableau 8: Modification de la prise du glucose ($\mu\text{g}/\text{min}$) par le muscle pendant la perfusion d'ouabaine;

A: chez le chien normal (N=5)

B: chez le chien pancréatectomisé (N=6)

	N	Contrôle	Ouabaine		120	150 min.
		0-30	60	90		
A	5	1069 $\pm$ 292	1601 $\pm$ 574	2333 $\pm$ 376*	1320 $\pm$ 163	831 $\pm$ 210
B	6	2406 $\pm$ 438	2108 $\pm$ 396	2272 $\pm$ 488	2241 $\pm$ 562	2275 $\pm$ 668

* $p < 0,05$

La teneur en glucose de l'urine est mesurée dans le volume d'urine recueilli toutes les 30 minutes et est exprimée en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids de l'animal. Le glucose excrété dans l'urine pendant la période de contrôle est de 91,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ chez le chien normal et n'augmente pas significativement pendant la perfusion d'ouabaine.

Les chiens pancréatectomisés excrètent en moyenne 6050 μg de glucose par kg pendant la période de contrôle; le taux de glucose de l'urine augmente régulièrement pendant la perfusion d'ouabaine, atteint un maximum de +194 % ($p < 0,05$) 30 minutes après la fin de la perfusion et retombe aux valeurs de contrôle 30 minutes plus tard (Figure 6).

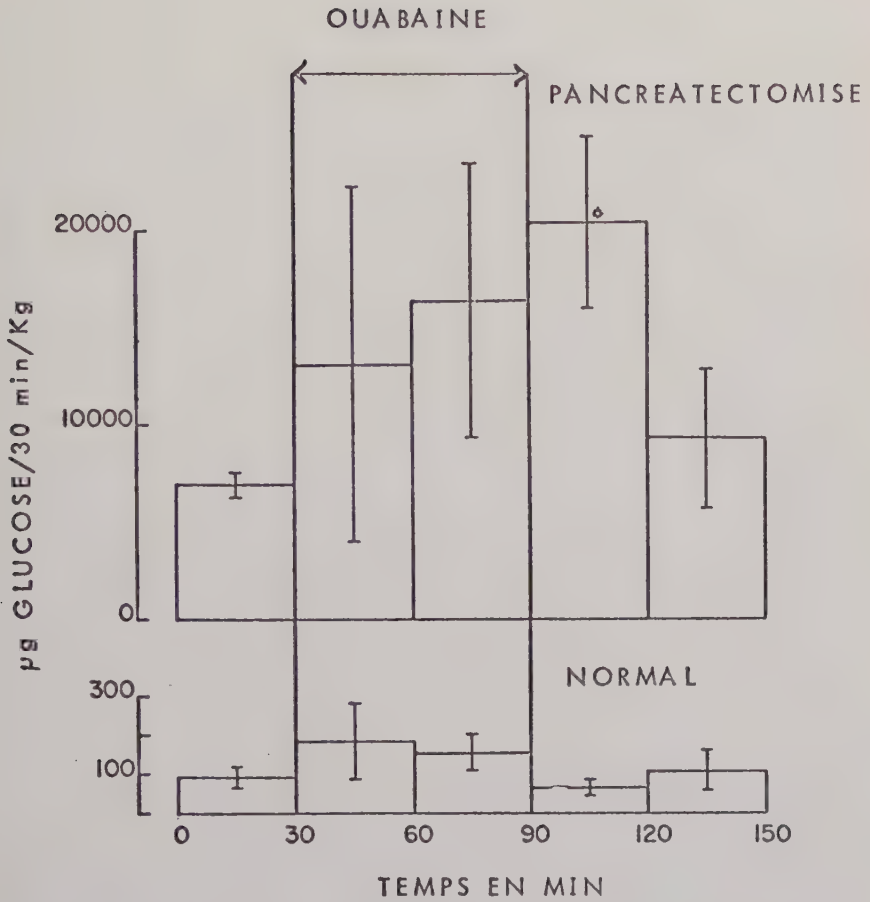


Figure 6: Modification du glucose urinaire pendant la perfusion d'ouabaine ($1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) chez le chien normal et pancréatectomisé.

* $p < 0,05$

DISCUSSION

Pendant la perfusion d'ouabaine chez le chien normal, le taux de glucose plasmatique diminue et la prise du glucose par le foie et le muscle augmente; l'augmentation de la prise du glucose par le foie est accompagnée d'un mouvement des ions potassium dans la même direction. Chez le chien pancréatectomisé, nous observons une légère baisse, non significative, du glucose plasmatique; le taux de glucose et de potassium dans la veine hépatique augmente nettement par rapport à la veine porte, tandis que la prise du glucose par le muscle ne change pas. La comparaison des différences porto-hépatique et artérioveino-fémorale chez le chien normal et pancréatectomisé montre que l'action de l'ouabaine n'est pas la même dans les deux groupes de chiens.

Chez le chien pancréatectomisé, l'augmentation du débit hépatique du glucose, accompagné d'une perte de K^+ , correspondrait à une action directe de l'ouabaine sur le foie; cet effet n'est visible qu'en l'absence d'insuline. La même observation a été faite dans le foie isolé perfusé avec une solution d'ouabaine $10^{-6}M$, confirmant une action directe de ce composé dans le foie. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cet effet direct de l'ouabaine sur le foie: 1) l'inhibition de la $Na^+, K^+ - ATPase$ par l'ouabaine produit une perte de potassium intracellulaire; ceci impliquerait une étroite relation entre l'activité de cette enzyme et le métabolisme du glucose dans le foie; 2) quelques

expériences préliminaires ont montré, indirectement ou par une mesure directe de l'activité de la phosphodiesterase de l'AMP cyclique, que l'ouabaine inhiberait cette enzyme. Il en résulterait une accumulation d'AMP cyclique, suffisante pour stimuler la glycogénolyse. Ces deux explications sont entièrement spéculatives et devront être prouvées expérimentalement.

Etant donnée la légère baisse du glucose plasmatique pendant la perfusion d'ouabaine chez les chiens pancréatectomisés, un autre mécanisme doit intervenir. Les observations précédentes (augmentation du débit hépatique du glucose, pas de modification de la prise du glucose par le muscle) ne seraient pas compatibles avec une diminution du glucose plasmatique. Pour les clarifier, le glucose excrété dans l'urine avant, pendant et après la perfusion d'ouabaine fut mesuré: il augmente fortement pendant l'administration d'ouabaine chez les chiens pancréatectomisés, alors qu'il ne change pas d'une façon significative chez les chiens intacts. La diminution du seuil de réabsorption tubulaire maximum du glucose (Tm_G) pourrait expliquer cette différence: chez le chien normal, le glucose plasmatique reste inférieur au Tm_G , alors que chez le chien pancréatectomisé il lui est toujours supérieur.

L'augmentation de la prise du glucose par le foie et le muscle, chez le chien normal, semble indiquer que l'in-

suline est le médiateur de l'action de l'ouabaine in vivo. En effet, l'augmentation de la prise du glucose par le foie et le muscle n'est pas observée chez le chien pancréatectomisé et correspond aux propriétés connues de l'insuline (Mortimore 1963, Haft 1958, Spiro 1958, Huston 1962, Madison 1958, 1960) de même que l'entrée du potassium dans la cellule hépatique (Zierler 1966).

Quelle est la nature de l'interaction de l'ouabaine et de l'insuline: s'agit-il d'une synergie de l'action de l'ouabaine et de l'insuline, ou l'ouabaine augmente-t-elle le taux plasmatique d'insuline?

Triner et coll. (1968 c), Loubatières et coll. (1968) ont mesuré le taux plasmatique d'insuline avant, pendant et après la perfusion d'ouabaine; ils ont observé que l'insuline plasmatique augmente pendant la perfusion d'ouabaine et que cette augmentation est plus forte dans le sang portal que périphérique. L'élévation du taux d'insuline ne serait ainsi pas due à une action de l'ouabaine sur les enzymes hépatiques inactivant l'insuline; cette observation confirme aussi l'hypothèse que l'ouabaine augmenterait la sécrétion d'insuline. Milner (1967, 1968) a montré, in vitro, que l'ouabaine, 10^{-5} - 10^{-6} M, stimule la sécrétion d'insuline par le pancréas.

Par quel mécanisme l'ouabaine stimule-t-elle la sécrétion d'insuline? Plusieurs hypothèses se présentent:

- 1) l'augmentation du sodium intracellulaire résultant de l'inhibition de la Na^+, K^+ -ATPase (Milner 1967)
- 2) l'augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire aux ions calcium, secondaire à l'inhibition de la Na^+, K^+ -ATPase (Milner 1968)
- 3) l'inhibition de la phosphodiesterase de l'AMP cyclique, produisant une accumulation d'AMP cyclique qui stimule la sécrétion d'insuline. L'AMP cyclique, comme l'ouabaine, modifierait la perméabilité de la membrane cellulaire aux ions calcium ou la liaison de ces ions à la membrane (Rasmussen 1968). Dans ce cas, l'ouabaine agirait comme les catécholamines
- 4) l'augmentation de l'AMP cyclique et l'inhibition de la Na^+, K^+ -ATPase simultanément.

Le stimulateur direct de la sécrétion d'insuline serait le calcium; cet ion, en effet, règle l'activité de nombreuses enzymes et la sécrétion de nombreuses substances, hormone ou transmetteur neurochimique.

Nous savons d'autre part (Doherty 1966) que, dans l'organisme vivant, les glucosides cardiotoniques s'accumulent d'une façon préférentielle dans les reins, le coeur, le pancréas et le foie. In vivo l'ouabaine n'atteint, dans le tissu musculaire et adipeux, qu'une faible concentration insuffisante pour agir sur les systèmes enzymatiques sensibles à l'action de l'ouabaine in vitro, où la concentration

d'ouabaine est plus forte. Toutefois, la concentration atteinte dans le pancréas in vivo serait suffisante pour provoquer la sécrétion d'insuline, probablement en modifiant la perméabilité de la membrane cellulaire.

En conclusion, toutes ces observations montrent que l'insuline est le médiateur de l'action hypoglycémique de l'ouabaine in vivo. Etant données les propriétés de l'insuline, cette hormone pourrait aussi être le médiateur de l'action antilipolytique et adrénolytique de l'ouabaine in vivo.

C O N C L U S I O N

L'ouabaine, *in vitro* et *in vivo*, est un inhibiteur de la lipolyse, de la glycogénolyse et de la glycolyse; cette drogue antagonise aussi les effets métaboliques des catécholamines. Dans ce travail, nous avons cherché à comprendre par quel mécanisme l'ouabaine exerce son action sur ces voies métaboliques. A cet effet, deux groupes d'expériences ont été faites, les unes *in vitro* sur des tissus isolés, les autres *in vivo* sur des chiens.

Les expériences *in vitro* eurent pour but de préciser le point d'action et d'analyser, d'une manière indirecte, le mécanisme d'action de l'ouabaine. Dans une série d'expériences, nous avons étudié l'action de l'ouabaine sur la lipolyse du tissu adipeux, dans une autre, l'action de cette drogue sur la glycogénolyse et la glycolyse du diaphragme.

Le système lipolytique se prêtait bien à cette étude; c'est un modèle simple, réglé par deux systèmes d'enzymes: les lipases et le système contrôlant la formation d'AMP cyclique; ce dernier système comprend deux enzymes: l'adenyl cyclase, qui catalyse la formation d'AMP cyclique à partir d'ATP et la phosphodiesterase, qui transforme l'AMP cyclique en 5'-AMP; l'AMP cyclique stimule l'activité de la triglyceride lipase. Du tissu épидидymaire de

rat a été incubé dans un milieu de Krebs-Ringer phosphate, contenant 5% d'albumine, pH 7,4, pendant une heure à 37°C, en présence d'ouabaine et de drogues, dont le mode d'action sur la lipolyse est connu: les catécholamines activant l'adényl cyclase, le dibutyryl-AMP cyclique activant la lipase et la théophylline, inhibant la phosphodiesterase. A une concentration de $5 \times 10^{-5} \text{M}$ l'ouabaine inhibe la lipolyse stimulée par l'adrénaline. A cette concentration, l'interaction de l'ouabaine et de l'adrénaline est compétitive, indiquant que l'ouabaine agirait directement sur l'adényl cyclase. A plus forte concentration, 10^{-4}M , l'ouabaine ne se comporte plus comme un inhibiteur compétitif de l'adrénaline: elle diminue aussi l'action lipolytique du dibutyryl-AMP cyclique et de la théophylline; l'ouabaine 10^{-4}M inhiberait donc aussi l'action de la lipase. Des résultats analogues furent obtenus lorsque la lipolyse fut stimulée par la noradrénaline et l'isoprotérenol.

Des expériences semblables ont été faites sur le diaphragme de rat incubé dans un milieu de Krebs-Ringer phosphate, pH 7,4, contenant 200 mg% de glucose. En présence d'ouabaine 10^{-4}M , le taux de glycogène du diaphragme et la prise du glucose augmentent, la formation totale d'acide lactique et pyruvique diminue, le G-1-P ne change pas. Ces résultats indiquent que l'ouabaine augmente la glycogénèse et inhibe la glycogénolyse, probablement au

niveau de la synthétase du glycogène et de la phosphorylase. L'ouabaine produit aussi une accumulation de G-6-P et F-6-P, mais le F-1-6-P diminue, indiquant une inhibition de la phosphofructokinase. Les systèmes enzymatiques glycogénolytique et glycogénétique sont comparables au système lipolytique; ils comprennent deux groupes d'enzymes: l'enzyme spécifique du système, la synthétase du glycogène ou la phosphorylase, et le système contrôlant la formation d'AMP cyclique, activateur de ces enzymes. L'ouabaine modifierait l'activité de la phosphorylase et de la synthétase du glycogène directement et indirectement secondairement à l'inhibition de l'adényl cyclase. La phosphofructokinase étant sensible aux mêmes stimuli que la phosphorylase, l'ouabaine pourrait agir de la même manière sur la phosphofructokinase que sur la phosphorylase.

Les expériences in vivo furent destinées à déterminer si les effets métaboliques de l'ouabaine *in vivo* sont dus à son action directe, observée *in vitro*, sur les enzymes contrôlant la lipolyse et la glycolyse des tissus musculaires et adipeux, ou à une action indirecte par l'intermédiaire de l'insuline, comme l'avait suggéré une première série d'expériences de ce laboratoire. A cet effet, nous avons comparé les effets de l'ouabaine chez des chiens normaux et chez des chiens pancréatectomisés. Les chiens des deux groupes reçurent une dose d'ouabaine de $1 \mu\text{g/kg/min}$ pendant 60 minutes; cette dose, qui est 4 fois supérieure à la

dose thérapeutique, n'a pas entraîné de signes d'intoxication.

Chez les animaux normaux, l'ouabaine abaisse le taux de glucose du sang périphérique; la différence porto-hépatique du glucose et du potassium change significativement pendant la perfusion d'ouabaine (+6,6 à -13,2 mg/100ml); en effet le taux de glucose et de potassium dans la veine hépatique devient inférieur à celui de la veine porte, indiquant qu'en présence d'ouabaine, le foie prend du glucose; il en est de même pour le potassium. La prise du glucose par le muscle de la pattepostérieure augmente aussi pendant la perfusion d'ouabaine. La quantité de glucose excrété dans l'urine ne change pas significativement par rapport à la période de contrôle.

Chez le chien pancréatectomisé, l'ouabaine diminue légèrement le taux de glucose du sang périphérique; la différence porto-hépatique du glucose augmente significativement pendant la perfusion d'ouabaine (+5,3 à 30,2 mg/100 ml): le taux de glucose est plus élevé dans la veine hépatique que dans la veine porte, indiquant que le foie libère du glucose; il en est de même pour le K^+ . La différence artério-veineuse du muscle ne change pas. Le glucose excrété dans l'urine augmente significativement pendant la perfusion d'ouabaine; cela expliquerait la légère baisse de la glycémie périphérique, qui se produit

malgré l'augmentation du débit hépatique du glucose.

Ces résultats indiquent que l'insuline est le médiateur de l'action hypoglycémique de l'ouabaine *in vivo* et probablement aussi de ses autres effets métaboliques.

Il semblerait donc que le mécanisme de l'action de l'ouabaine serait différent *in vitro* et *in vivo*: *in vitro* l'ouabaine a une action directe sur le métabolisme; *in vivo* son action est indirecte. Cette différence entre les observations *in vitro* et *in vivo* pourrait être plus apparente que réelle: en effet la distribution de l'ouabaine dans l'organisme vivant est sélective; ce composé administré *in vivo* atteint dans le pancréas une concentration considérablement plus élevée que dans le tissu adipeux et musculaire; il se pourrait que cette concentration soit suffisante pour modifier l'activité de la Na^+, K^+ -ATPase et stimuler la sécrétion d'insuline.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahlquist R.P. 1948. A study of the adrenotropic receptors.
Am.J.Physiol. 153: 586-600.
- Ahmed K., Judah J.D. 1965. Identification of active phosphoprotein in a cation-activated adenosine triphosphatase.
Biochim.Biophys.Acta 104: 112-120.
- Albers R.W. 1967. Biochemical aspects of active transport.
Ann.Rev.Biochem. 36: 727-756.
- Auditore J.V. 1962. Sodium-potassium activated G-Strophantinsensitive ATPase in cardiac muscle.Proc.Soc.exp.Biol., N.Y. 110: 595-597.
- Auditore J.V. 1964. Character of G-Strophantins inhibition of the Na^+, K^+ -activated ATPase. Arch.Int.Pharmacodyn. 149: 90-98.
- Banks P. 1967. The effect of ouabain on the secretion of catecholamines and on the intracellular concentration of potassium. J.Physiol.(London) 193: 631-637.
- Bergmeyer H.U., Klotsch H. 1963. Methods of Enzymatic Analysis, ed.H.U. Bergmeyer, Academic Press, New York.
- Berson S.A., Yalow R.S., Bauman A., Rotschild H.A., Newerly K. 1956. Insulin- I^{131} metabolism in human subjects: Demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects. J.Clin.Invest. 35: 170-190.

- Bihler I., Sawh P.C. 1968. Stimulation by cardiac glycosides of sugar transport in muscle. *Federation Proc.* 27: 495.
- Bogdanski D.F., Tissari A., Brodie B.B. 1968. Role of Na^+ and K^+ , ouabain and reserpine in uptake, storage and metabolism of biogenic amines in synaptosomes. *Life Sciences* 7: 419-428.
- Bonting S.L., Caravaggio L.L., Hawkins N.M. 1961. Studies on sodium, potassium-activated adenosine triphosphatase. I. Quantitative distribution in several tissues of the cat. *Arch. Biochem. Biophys.* 95: 416-423.
- Bonting S.L., Caravaggio L.L. 1962. Sodium, potassium-activated adenosine triphosphatase in the squid giant axon. *Nature (London)* 194: 1180-1181.
- Brady M., Higgins S.A. 1967. The properties of lipoprotein-lipases of rat heart, lung and adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 137: 140-146.
- Brodie B.B., Davies J.I., Hynie S., Krishna G., Weiss B. 1966. Interrelationship of catecholamines with other endocrine systems. *Pharmacol. Rev.* 18: 273-289.
- Butcher R.W., Sutherland E.W. 1962. Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and the use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *J. Biol. Chem.* 237: 1244-1250.

- Butcher R.W. 1966. Cyclic 3',5'-AMP and the lipolytic effect of hormones on adipose tissue. *Pharmacol.Rev.* 18: 237-241.
- Butcher R.W.,Sutherland E.W. 1967. The effects of catecholamines,adrenergic blocking agents,prostaglandin E_1 and insulin on cyclic AMP levels in rat epididymal fat pad in vitro. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 139: 849-859.
- Butcher R.W.,Biard C.E.,Sutherland E.W. 1968. Effects of lipolytic and antilipolytic substances on 3',5'-AMP levels in isolated fat cells. *J.Biol.Chem.* 247: 1705-1712.
- Cade J.R.,Shalhoub R.J.,Canessa-Fisher M.,Pitts R.F. 1961. Effect of strophanthidin on the renal tubules of dogs. *Am.J.Physiol.* 200: 373-379.
- Caprio A.,Farah A. 1967. The effect of ionic milieu on the response of rabbit cardiac muscle to ouabain. *J.Pharm. Exptl.Ther.* 155: 403-414.
- Carmeliet E.E.,Verdonck F. 1967. Interaction between ouabain and butiridine,a β -adrenergic blocking agent on the heart. *Europ.J.Pharmacol.* 1: 269-277.
- Charnock J.S.,Rosenthal A.S.,Post R.L. 1963. Studies on the mechanism of action of cations transport. II.A phosphorylated intermediate in the cation stimulated enzymic hydrolysis of adenosine triphosphate. *Aust.J.exp.Biol. med.Sci.* 41: 675.
- Clark A.J. 1912. The influence of ions upon the action of digitalis. *Proc.Roy.soc.med.* 5,Ther.Pharmacol.Sect. p.181.

- Clausen T. 1965. Stimulation of glycogen deposition and inhibition of lactic acid production in diaphragm, induced by ouabain. *Biochim.Biophys.Acta* 109: 164-171.
- Clausen T. 1966. Effects of K^+ -free medium, ouabain and insulin upon the fate of glucose in rat diaphragm. *Biochim. Biophys.Acta* 120: 361-367.
- Conn H.L., Jr. 1956. Effects of digitalis and hypoxia on potassium transfer and distribution in the dog heart. *Am.J.Physiol.* 184: 548-552.
- Conway E.J., Kernan R.P., Zadunaisky J.A. 1961. The sodium pump in skeletal muscle in relation to energy barriers. *J.Physiol.* 155: 263-279.
- Csáky T.Z. 1961. Effect of cardiac glycosides on the active biological transport of non-electrolytes. *Biochem. Pharmacol.* 8: 38.
- Csáky T.Z. 1963. Effect of cardioactive steroids on the active transport of non-electrolytes. *Biochim.Biophys. Acta* 74: 160-162.
- Csáky T.Z., Hara Y. 1965 a. Inhibition of active intestinal sugar transport by digitalis, *Amer.J.Physiol.* 209:467-472.
- Csáky T.Z., Prachnobom K., Eiseman B., Ho P.H. 1965 b. The effect of digitalis on the renal tubular transport of glucose in normal and heartless dogs. *J.Pharm.Exptl.Ther.* 150: 275-278.

- Danforth W.H. 1965. Control of energy metabolism. *J.Biol. Chem.* 240: 588-593.
- Daniel E.E., Robinson K. 1960. The relation of sodium secretion to metabolism in isolated sodium-rich uterine segments. *J.Physiol.* 154: 445-460.
- Davidson J.K., Ashworth M.A., Coddling J.A., Haist R.E. 1967. A comparison of rates of disappearance of injected I^{131} -insulin and TSIA from serum of totally pancreatectomized dogs. *Excerpta Med. Intern. Congr. Ser.* 140: 72.
- Davoren P.R., Sutherland E.W. 1963. Cellular location of adenyl cyclase in pigeon erythrocytes. *J.Biol.Chem.* 238: 3016-3023.
- Delange R.J., Kemp R.G., Dixon-Riley W., Cooper R.A., Krebs E.G. 1968. Activation of skeletal muscle phosphorylase-kinase by ATP and 3',5'-AMP. *J.Biol.Chem.* 243: 2200-2208.
- Dengler H.J., Michaelson I.A., Spiegel H.E., Titus E. 1962. The uptake of labeled norepinephrine by isolated brain and other tissues of the cat. *Int.J.Neuropharmacol.* 1: 23-38.
- Diamond J. 1962. The reabsorptive function of the gall bladder. *J.Physiol.* 161: 442-473.
- Doherty J.E., Perkins W.H. 1966. Tissue concentration and turnover of tritiated digoxin in dogs. *Am.J.Cardiol.* 17: 47-52.

- Dole V.P. 1956. A relationship between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *J.Clin.Invest.* 35: 150-154.
- Douglas W.W., Rubin R.P. 1963. The mechanism of catecholamines release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J.Physiol. (London)* 167: 288-310.
- Dunham E.T., Glynn I.M 1961. Adenosine triphosphatase activity and the active movement of alkali metal ions. *J.Physiol. (London)* 156: 274-293.
- Entman M.L., Cook J.W., Jr, Bressler R. 1969. The influence of ouabain and alpha-angelica lactone on calcium metabolism of dog cardiac microsomes. *J. Clin. Invest.* 48: 229-234.
- Fassina G., Contessa A.R. 1967. Digitoxin and prostaglandin E_1 as inhibitors of catecholamine-stimulated lipolysis and their interaction with Ca^{++} in the process. *Biochem.Pharmacol.* 16: 1447-1453.
- Fassina G. 1967 a. Antagonistic action of metabolic inhibitors on dibutyryl cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate - and caffeine-stimulated lipolysis in vitro. *Life Sciences* 6: 825-831.
- Fisher E.H., Krebs E.G. 1955. Conversion of muscle phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J.Biol.Chem.* 216: 121-132.

- Friedman D.L., Larner J. 1962. Interconversion of two forms of muscle UDPG- α -glucan transglucosylase by a phosphorylation-dephosphorylation reaction sequence. *Biochim.Biophys.Acta* 64: 185-186.
- Garrahan P.J., Glynn I.M. 1967. The behaviour of the sodium pump in red cells in the absence of external potassium. *J.Physiol.(London)* 192: 159-174.
- Geigy Documenta 1962. Scientific tables p.145-198.
Ed. K.Diem. Geigy Pharmaceuticals, Ardsley, New York.
- Glynn I.M. 1957. The effect of cardiac glycosides on sodium and potassium movements in human red cells. *J.Physiol.* 136: 148-173.
- Glynn I.M. 1964. The action of cardiac glycosides on ion movements. *Pharmacol.Rev.* 16: 381-407.
- Godfraind T., Godfraind-de Becker A. 1962. Action de la digitoxine sur les mouvements du ^{42}K au niveau de l'iléon isolé de cobaye. *Arch.Int.Physiol.* 70: 738-741.
- Gordon E.E. 1965. Influence of ouabain on metabolism of rat kidney. *Biochim.Biophys.Acta* 104: 606-608.
- Gordon E.S., Jr., Cherkes A. 1956. Unesterified fatty acid in human blood plasma. *J.Clin.Invest.* 35:206-212.

- Gorin E., Shafrir E. 1964. Lipolytic activity in adipose tissue homogenate towards tri- and mono-glyceride substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 84: 24-34.
- Gourley D.R.H. 1964. Effect of ouabain on K^+ exchange in skeletal muscle. *J.Pharm.Exptl.Ther.* 146: 307-312.
- Grossmann A., Furchgott R.F. 1964. The effect of external calcium in resting and beating guinea-pig auricles. *J.Pharmacol.Exptl.Ther.* 143:107-119.
- Haft D.E., Miller L.L. 1958. Alloxan diabetes and demonstrated direct action of insulin on metabolism of isolated perfused rat liver. *Am. J. Physiol.* 192: 33-42.
- Hazon V., Troschi G. 1959. Electron microscopy on microsomal fractions from rat brain. *Exptl. Cell. Res.* 16: 256-271.
- Himms-Hagen J. 1967. Sympathetic regulation of metabolism. *Pharmacol.Rev.* 19: 367-461.
- Ho R.J., Jeanrenaud B., Renold A.E. 1966. Ouabain-sensitive fatty acid release from isolated fat cells. *Experientia* 22: 86-89.
- Ho R.J., Jeanrenaud B. 1967 a. Insulin-like action of ouabain. I. Effect on carbohydrate metabolism. *Biochim.Biophys.Acta* 144: 61-73.

- Ho R.J., Jeanrenaud B., Posternak T.H., Renold A.E.
1967b. Insulin-like action of ouabain. II. Primary antilipolytic effect through inhibition of adenylyl cyclase. *Biochim. Biophys. Acta* 144: 74-82.
- Hoffman J.F. 1960. The link between metabolism and the active transport of Na in human red cell ghosts. *Fed. Proc.* 19: 127.
- Hoffman J.F. 1966. Red cell membrane and transport of sodium and potassium. *Am. J. Med.* 41: 666-680.
- Holland W.C., Klein R.L. 1959. The effect of acetylcholine, ouabain and quinidine on the transmembrane flux of K^{42} in isolated rabbit atria. *Fed. Proc.* 18:403.
- Hollenberg C.H., Raben M., Astwood E. 1961. The lipolytic response of corticotropin. *Endocrinology* 68: 589-598.
- Huijing F., Larner J. 1966. On the mechanism of action of 3', 5'-AMP. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 56:647-653.
- Huston C.J.W., Adams L.C., Field R.A., McDermott W.V., Jr. 1962. Effect of insulin on glucose uptake by the isolated perfused canine liver. *Lancet* 1: 357-359.
- Jelinkova-Tenorova M., Hruza Z. 1963. Effect of epinephrine on fat metabolism in old rats. *Gerontologia* 7: 168-180.

- Joyce C.R.B., Weatherall M. 1955. Cardiac glycosides and the potassium exchange of human erythrocytes. *J. Physiol.* 127: 33P.
- Judah J.D., Ahmed K. 1964. The biochemistry of sodium transport. *Biol. Rev.* 39: 160-193.
- Kahn J.B., Jr., Acheson G.H. 1955. Effects of cardiac glycosides and other lactones, and of certain other compounds on cation transfer in human erythrocytes. *J. Pharmacol.* 115: 305-308.
- Kelly H.G., Wong S.Y. 1961. Effects of intravenous digoxin on blood pressure, serum electrolytes, renal hemodynamics and excretory function in normal and hypertensive subjects and subjects in congenital heart failure. *Can. Med. Assoc. J.* 85: 1131-1135.
- Kingsolving C.R., Post R.L., Beaver D.L. 1963. Sodium plus potassium transport adenosine triphosphatase activity in the kidney. *Biophys. Acta* 62: 85-93.
- Krebs E.G., Graves D.J., Fisher E.H. 1959. Factors affecting the activity of muscle phosphorylase-b-kinase. *J. Biol. Chem.* 234: 2867-73.
- Krebs E.G., Love D.S., Bratvold G.E., Trayser K.A., Meyer W.L., Fisher E.H. 1964. Purification and properties of rabbit skeletal muscle phosphorylase-b-kinase. *Biochemistry* 3: 1022-33.

Krebs E.G., Delange R.J., Kemp R.G., Riley W.D. 1966.

B. Activation of skeletal muscle phosphorylase.

Pharmacol. Rev. 18: 163-171.

Kujalova V., Mosinger B. 1966. Cold- and ouabain-

sensitive uptake of glucose stimulated by insulin

in incubated rat adipose tissue. Biochim. Biophys.

Acta 127: 255-257.

Kypson J., Triner L., Nahas G.G. 1968 a. Effects of

ouabain and K^+ -free medium on activated lipolysis

and epinephrine-stimulated glycogenolysis. J. Pharma-

col. Exptl. Therap. 159: 8-17.

Kypson J., Triner L., Nahas G.G. 1968 b. The effects

of cardiac glycosides and their interaction with

catecholamines on glycolysis and glycogenolyses in

skeletal muscle. J. Pharmacol. Exptl. Therap.

164: 22-30.

Lambert M., Neish A.C. 1950. Rapid method for estimation

of glycerol in fermentation solutions. Can. J. Res.

28: 83-89.

Larner J. 1966. Hormonal and non-hormonal control of

glycogen metabolism. Trans. N.Y. Acad. Sci. 29: 192-209.

Lee A. St. John, dans Nahas G.G., Triner L., Small H.S.,

Manger W.M., Habif D.V. 1966. Alteration in O_2

uptake following hemorrhage in dogs. Amer. J.

Physiol. 210: 1009-14.

- Lee K.S., Yu D.H., Lee D.I. 1961. The influence of potassium and calcium on the effect of ouabain on cat capillary muscles. *J. Pharmacol.* 132: 139-148.
- Lee K.S., Choi S.J. 1966. Effect of the cardiac glycosides on the calcium uptake of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Pharm. Exptl. Ther.* 153: 114-120.
- Lineweaver H., Burk D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem.Soc.* 56: 658-666.
- Loubatières M.A., Mariani M.M., Savi L. et al. 1968. Effets insulino-sécréteurs de l'ouabaine mis en évidence "in vivo" chez le chien. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 266: 2505-2507.
- Lown B., Black H., Moore F.D. 1960. Digitalis, electrolytes and the surgical patient. *Am. J. Cardiol.* 6: 309-337.
- Madison L.L., Unger R.H. 1958. The physiologic significance of the secretion of endogenous insulin into portal circulation. I. Comparison of the effects of glucagon-free insulin administered via the portal vein and via a peripheral vein on the magnitude of hypoglycemia and peripheral glucose utilization. *J. Clin. Invest.* 37: 631-639.

- Madison L.L., Unger R.H., Rencz 1960. The physiologic significance of secretion of insulin into portal circulation. II. Effect of rate of administration of glucagon-free insulin on magnitude of peripheral and hepatic actions. *Metabolism* 9: 97-108.
- Mann J.T., Tove S.B. 1966. Purification and properties of a lipase from rat adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 241: 3595-3599.
- Mansour T.E., Mansour J.M. 1962. Effect of serotonin and adenosine 3', 5'-phosphate on phosphofructokinase from liver fluke *fasciola hepatica*. *J. Biol. Chem.* 237: 629-634.
- Mansour T.E. 1963. Studies on heart phosphofructokinase: purification, inhibition and activation. *J. Biol. Chem.* 238: 2285-2292.
- Mansour T.E. 1965. Studies on the heart phosphofructokinase. Active and inactive form of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 240: 2165-2172.
- Matsui H., Schwartz A. 1966. Purification and properties of a highly active ouabain-sensitive Na^+ , K^+ -dependant adenosine-triphosphatase from cardiac tissue. *Biochim. Biophys.* 128: 380-390.
- Matsui H., Schwartz A. 1966 a. Kinetic analysis of ouabain K^+ and Na^+ interaction on a Na^+ , K^+ -dependant adenosine-triphosphatase from cardiac muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25: 147-152.

- Matsui H., Schwartz A. 1968 a. Mechanism of cardiac glycoside inhibition of the Na^+, K^+ -dependant ATPase from cardiac muscle. *Biochim.Biophys.Acta* 151: 655-663.
- McLane T.K. 1964. A biphasic action of ouabain on sodium transport in the toad bladder. *J.Pharm.Exptl.Ther.* 148: 106-110.
- Milner R.D.G., Hales C.N. 1967. The sodium pump and insulin excretion. *Biochim.Biophys.Acta* 135: 375 - 377.
- Milner R.D.G., Hales C.N. 1968. Cations and the secretion of insulin. *Biochim.Biophys.Acta* 150: 165 - 167.
- Morgan H.E., Parmeggiani A. 1964. Regulation of glycogenolysis in muscle. II. Control of glycogen phosphorylase reaction in isolated perfused heart. III. Control of muscle glycogen phosphorylase activity. *J.Biol.Chem.* 239: 2435 - 2445.
- Mortimore G.E. 1963. Effect of insulin on release of glucose and urea by isolated rat liver. *Am.J.Physiol.* 204: 699-704.
- Mosinger B., Kujalova V. 1966. Potassium-dependant liponobilizing effect of adrenalin on incubated adipose tissue. *Biochim.Biophys.Acta* 116: 174-177.
- Müller P. 1965. Ouabain effects on cardiac contraction, action potential and cellular potassium. *Circul.Res.* 17: 46-56.
- Nayler W.G. 1967. Calcium exchange in cardiac muscle: A basic mechanism of drug action. *Am.Heart J.* 73: 379- 394.
- Palmer R.F., Nechay B.R. 1964. Biphasic renal effect of ouabain in the chicken: correlation with a microsomal Na^+, K^+ -stimulated ATPase. *J.Pharm.Exptl.Ther.* 146: 92-98.

- Parmeggiani A., Morgan H.E. 1962. Effect of adenine nucleotides and inorganic phosphate on muscle phosphorylase activity. *Biochim.Biophys.Res.Comm.* 9: 252-256.
- Passonneau J.V., Lowry O.H. 1962. Phosphofructokinase and the Pasteur effect. *Biochim.Biophys.Res.Comm.* 7: 10-15.
- Passonneau J.V., Lowry O.H. 1963. Phosphofructokinase and the control of the citric acid cycle. *Biochim.Biophys.Res. Commun.* 13: 372-379.
- Post R.L., Merritt C.R., Kingsolving C.R., Albright C.D. 1960. Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte. *J.Biol.Chem.* 235: 1796-1802.
- Post R.L., Rosenthal A.S. 1962. An intermediate compound in active transport. *J.Gen.Physiol.* 45: 614A.
- Post R.L., Sen A.K., Rosenthal A.S. 1965. A phosphorylated intermediate in adenosine triphosphate-dependant sodium and potassium transport across kidney membranes. *J.Biol.Chem.* 240: 1437-1445.
- Post.R.L., Sen A.K. 1967. Reaction of ouabain with Na^+, K^+ -ATPase. *Fed.Proc.* 26: 592.
- Rabinowitz M., Desalles L., Meisler J., Lorand L. 1965. Distribution of adenyl cyclase activity in rabbit skeletal muscle fractions. *Biochim.Biophys.Acta* 97: 29.
- Rall T.W., Sutherland E.W., Wosilait W.D. 1956 a. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. III.Reactivation of liver phosphorylase in slices and in extracts. *J.Biol.Chem.* 218: 483- 495.

- Rall T.W., Wosilait W.D., Sutherland E.W. 1956 b. Interconversion of phosphorolase a and phosphorylase b from dog heart muscle. *Biochim.Biophys.Acta* 20: 69-76.
- Rall T.W., Sutherland E.W., Berthet J. 1957. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. *J.Biol.Chem.* 224: 463-475.
- Rall T.W., Sutherland E.W. 1958. Formation of a cyclic ribonucleotide by tissue particles. *J.Biol.Chem.* 232: 1065- 1076.
- Ramsey A.G. 1967. Effect of ouabain on Na^+, K^+ excretion in the rat. *Proc.Soc.Exptl.Biol.Med.* 126: 294-298.
- Randic M., Padjen A. 1967. Effect of calcium ion on the release of acetylcholine from the cerebral cortex. *Nature* 215: 990.
- Rasmussen H., Tenenhouse A. 1968. Cyclic adenosine monophosphate, Ca^{++} , and membranes. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 59: 1364-1370.
- Rayner B., Weatherall M. 1957. Digoxin, ouabain and potassium movements in rabbit auricles. *Brit.J.Pharmacol.* 12: 371-381.
- Regan T.J., Talmers F.N., Hellems H.K. 1956. Myocardial transfer of sodium and potassium: effect of acetyl-strophantidin in normal dogs. *J.Clin.Invest.* 35:1220-1228.

- Repke K. 1965. Effect of digitalis on membrane adenosine triphosphatase of cardiac muscle. Dans Proceedings of the Second International Pharmacological Meeting, Prague, p. 65-87, Pergamon Press, New York.
- Rizack M.A. 1961. An epinephrine-sensitive lipolytic activity in adipose tissue. J.Biol.Chem. 236: 657-662.
- Rizack M.A. 1964. Activation of an epinephrine-sensitive lipolytic activity from adipose tissue by adenosine 3',5'-phosphate. J.Biol.Chem. 239: 392-395.
- Robison G.A., Butcher R.W., Sutherland E.W. 1967. Adenyl cyclase as an adrenergic receptor. Ann.N.Y.Acad.Sci. 139: 703-723.
- Robison G.A., Butcher R.W., Sutherland E.W. 1968. Ann.Rev.Biochem. 37: 149-174.
- Rodbell M. 1967. Metabolism of isolated fat cells. V. Preparations of ghosts and their properties; adenyl cyclase and other enzymes. J.Biol.Chem. 242: 5744-5750.
- Rossell-Perez M., Larner J. 1964. Studies on UDPG- α -glucan transglucosylase. V. Two forms of the enzyme in dog skeletal muscle and their interconversion. Biochem. 3: 81-88.
- Saifer A., Gerstenfield S. 1958. The photometric microdetermination of blood glucose with glucose oxydase. J.Lab. Clin.Med. 51: 448-460.
- Schatzmann J.H. 1953. Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natriumtransport durch die Erythrocytenmembran. Helv.Physiol.Acta 11: 346-354.

- Schwartz A. 1962. A sodium- and potassium-stimulated adenosine triphosphatase from cardiac tissues. I. Preparation and properties. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 9: 301-306
- Schwartz 1966. Voir Matsui H. et Schwartz A. 1966.
- Schwartz A. 1968. Tritiated digoxin binding to $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -activated adenosine triphosphatase. Possible allosteric site. *Sciences* 160: 323-325.
- Seifter S., Dayton S., Novic B., Muntwyler E. 1950. The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Arch. Biochem.* 25: 191-200.
- Shafirir E. 1960. Release of glycerol during mobilization of unesterified fatty acids from adipose tissue. *Bull. Res. Council Israel, Sect. A*: 90.
- Siggaard-Andersen O. 1965. The acid-base status of the blood. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Skou J.C. 1957. The influence of some cations on the adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* 23: 394-401.
- Skou J.C. 1960. Further investigations on a $\text{Mg}^{++} + \text{Na}^+$ -activated adenosine triphosphatase, possibly related to the active linked transport of Na^+ and K^+ across the nerve membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 42: 6-23.
- Skou J.C. 1962. Preparation from mammalian brain and kidney of the enzyme system involved in active transport of Na^+ and K^+ . *Biochim. Biophys. Acta* 58: 314-325.

- Skou J.C. 1964. Enzymatic aspects of active linked transport of Na^+ and K^+ through the cell membrane. Progress in Biophys. and Biophys. Chem. 14: 133-166. Oxford.
- Skou J.C. 1965. Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. Physiol. Rev.45: 596-617.
- Spiro R.G., Ashmore J., Hastings A.B. 1958. Studies on carbohydrate metabolism in rat liver slices. XII. Sequence of metabolic events following acute insulin deprivation. J. Biol. Chem. 230: 761-771.
- Stone D.B., Mansour T.E. 1967. Phosphofructokinase from the liver fluke fasciola hepatica. I. Activation by adenosine 3', 5'-phosphate and by serotonin. Molecul.Pharmacol. 3: 161-176.
- Strand O., Vaughan M., Steinberg D. 1964. Rat adipose tissue lipases: hormone sensitive lipase activity against triglycerides compared with activity against low glycerides. J. Lipid. Res. 5: 554-562.
- Strickler J.C., Kessler R.H., Knutson B.A. 1961. Direct renal action of some digitalis steroids. J. Clin.Invest.40: 311-316.
- Sutherland E.W., Cori C.F. 1951. Effect of hyperglycemic-glycogenolytic factor and epinephrine on liver phosphorylase. J. Biol. Chem. 188: 531-543.

- Sutherland E.W. 1951. Effect of the hyperglycemic factor and epinephrine on enzyme systems of liver and muscle. Ann. N.Y. Acad. Sci. 54:693-706.
- Sutherland E.W., Rall T.W. 1958. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. J. Biol. Chem. 232: 1077-1091.
- Sutherland E.W., Rall T.W. 1960. The relation of adenosine 3', 5'-phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones. Pharmacol. Rev. 12: 265-299.
- Sutherland E.W., Rall T.W., Menon T. 1962. Adenyl cyclase I. Distribution, preparation and properties. J. Biol. Chem. 237: 1220-1227.
- Taylor C.B. 1963. The effect of mercurial diuretics on adenosine triphosphatase of rabbit kidney in vitro. Biochem. Pharmacol. 12: 539-550.
- Triner L., Kypson J., Nahas G.G. 1968 a. Hypoglycemic effect of ouabain in dogs. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 127: 1255-1258.
- Triner L., Kypson J., Nahas G.G. 1968.b. Hypoglycemic effect of ouabain in vivo. Clinical Res. XVI (N^o.2):353.
- Triner L., Killian P., Nahas G.G. 1968 c. Ouabain hypoglycemia: Insulin mediation. Sciences 162: 560-561.

- Tuttle R.S., Witt P.N., Farah A. 1961. The influence of ouabain on intracellular sodium and potassium concentrations in the rabbit myocardium. *J.Pharmacol.*133:281-287.
- Umbreit W.W., Burris R.H., Stauffer J.F. 1957. *Monometric Techniques*, Burgess Publishing Co., Minneapolis.
- Ussing H. 1949. Transport of ions across cellular membranes. *Physiol. Rev.* 29: 127-153.
- Vaughan M. 1962. The production and release of glycerol by adipose tissue incubated in vitro. *J. Biol.Chem.* 237: 3354-3358.
- Vaughan M., Berger J.E., Steinberg D. 1964. Hormone sensitive and monoglyceride lipase activities in adipose tissue. *J.Biol. Chem.* 239: 401-409.
- Walsh D.A., Perkins D.P., Krebs E.G. 1968. An 3', 5'-AMP dependant proteinkinase from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 243: 3763-3764.
- Weiss B., Davies J.I., Brodie B.B. 1966. Evidence for a role of 3', 5'-cyclic AMP in adipose tissue lipolysis. *Biochem. Pharmacol.* 15: 1553-1561.
- Wenke M. 1966. Effects of catecholamines on lipid mobilization. Dans *Advances in lipid research*, vol. 4, Ed. R. Paoletti, D. Kritchevsky. Academic Press New York, p. 69-105.
- Whittam R. 1958. Potassium movement and ATP in human red cells. *J. Physiol.* 140: 479-497.

- Whittam R., Wheeler K.P. 1961. The sensitivity of a kidney ATPase to ouabain and to sodium and potassium. *Biochim. Biophys. Acta* 51: 622-624.
- Whittam R. 1962. The asymmetrical stimulation of a membrane adenosine triphosphatase in relation to active cation transport. *Biochem. J.* 84: 110-118.
- Whittam R., Willis J.S. 1963. Ion movements and oxygen consumption in kidney cortex slices. *J. Physiol.* 168: 158-177.
- Wilbrandt W., Caviezel R. 1954. Die Beeinflussung des Austritts von Calcium aus dem Herzmuskel durch Herzglykosid. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta* 12: 6-40.
- Wilde W.S., Howard P.J. 1960. Renal tubular action of ouabain on Na and K transport during stop-flow and slow-flow technique. *J. Pharmacol.* 130: 232-238,
- Winegrad S., Shanes A.H. 1962. Calcium flux and contractibility of guinea pig atria. *J. Gen. Physiol.* 45:371-394.
- Wosilait W.D., Sutherland E.W. 1956. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. II. Enzymatic inactivation of liver phosphorylase. *J. Biol. Chem.* 218: 469-481.
- Yu D.H., Lee K.S. 1962. Effect of cardiac glycoside on Na^+ , K^+ -ATPase of heart microsomal fraction. *Pharmacologist* 4:164.
- Zierler K. 1966. Possible mechanisms of insulin action on membrane potentials and ion fluxes. *Am. J. Med.* 40:735-739.

